

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931

N° 6

CONTRIBUTION A LA TOXICOLOGIE
DES
DÉRIVÉS BARBITURIQUES

THÈSE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1930

PAR

FRÉDÉRIC LAGARCE

PHARMACIEN

ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

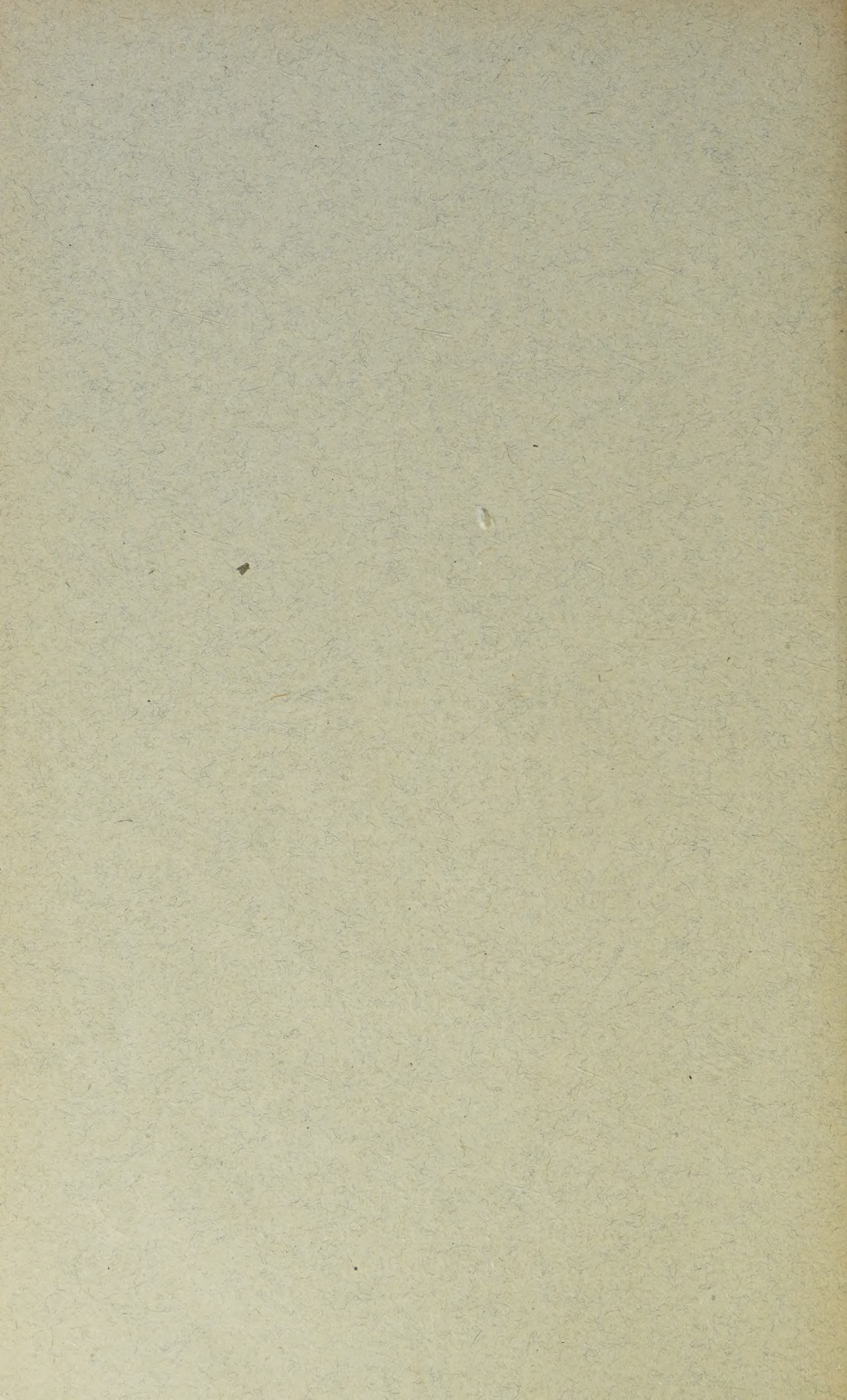
JURY { MM. GUERBET, *Président.*
HÉRISSEY, *Professeur.*
FABRE, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE SAGNE & CARDINAUX

148, BOULEVARD DE LA GARE

1930



UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-1931

N° 6

CONTRIBUTION A LA TOXICOLOGIE DES DÉRIVÉS BARBITURIQUES

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1930

PAR

FRÉDÉRIC LAGARCE

PHARMACIEN

ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

JURY { MM. GUERBET, *Président.*
HÉRISSEY, *Professeur.*
FABRE, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE SAGNE & CARDINAUX

148, BOULEVARD DE LA GARE

1930

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, DOYEN, O. *, O I.
 PERROT, ASSESSEUR, O. *, O I.
 G. DURSANT, SECRÉTAIRE, *, O I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. *, O I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut G. O. *,	Chimie organique.
PERROT, O. *, I.	Histoire naturelle des Médica- ments.
COUTIÈRE, O. *, O I.	Zoologie.
LEBEAU, O. *, O I.	Pharmacie chimique.
GUERBET, *, O I.	Toxicologie.
BOUGAULT, *, O I.	Chimie analytique.
GORIS, *, O I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, *, O I.	Botanique générale.
TASSILLY, *, O I.	Physique.
DAMIENS, O. *, I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, O I.	Chimie biocogique.
SOMMELET, *, O I.	Hydrologie et Hygiène.

Professeurs honoraires : MM. A VILLIERS, *, O I. , GRIMBERT, *, O I. , et
 DÉLÉPINE, O. *, O I.

CHARGÉS DE COURS

MM. MARC HONNORAT, *, O I.	Législation et Déontologie phar- maceutiques.
LUTZ, *, O I.	Cryptogamie.
LAUNOY, O. *, O I.	Pharmacodynamie.
FABRE, O. A.	Minéralogie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. LUTZ, *, O I.	MM. PIGON, O I.	MM. BACH, O I.
LAUNOY, O. *, O I.,	FABRE, O I.	BEDEL, O I.
DELABY, *, O I.	MASCRÉ, O I.	RÉGNIER, O I.
	FLEURY, O I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, O I., agrégé, chargé de T.P. de 1 ^{re} année	Chimie générale.
FABRE, O. A. , et RÉGNIER, O I., agrégés chargés des travaux de...	Chimie analytique.
SOUÈGES, O I.	Micrographie.
LEROUX, O I.	Physequé.
DEVAL, O I.	Microbiologie.
DELABY O. *, O I., PIGON, O I. .et	
FLEURY, O I. agrégés, chargés des Travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BAULIEUX, O I.



A Monsieur le Professeur Marcel GUERBET

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien honoraire des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur Paul CHÉRAMY

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Assistant à la Faculté de Pharmacie

*Témoignage de ma vive gratitude
pour ses précieux conseils et son
aide efficace.*

A Monsieur le Docteur F. TRÉMOLIÈRES

Médecin des Hôpitaux
Officier de la Légion d'Honneur

*Dont la grande bienveillance a mis
à notre disposition les moyens de travail.*

A Monsieur le Docteur A. TARDIEU

Médecin assistant à l'Hôpital Boucicaut

*En remerciement de son aimable
collaboration.*

A MES PARENTS

A MON FRÈRE

MEIS ET AMICIS

Contribution à la Toxicologie des dérivés barbituriques

INTRODUCTION

Chaque nouveau corps physiologiquement actif, introduit dans la pharmacopée courante, vient grossir le nombre des produits avec lesquels le toxicologue aura à compter.

Lorsque ce corps est susceptible de modifier complètement l'état affectif du sujet, d'atténuer, ou même de supprimer totalement l'élément douleur, son emploi, d'abord exclusivement thérapeutique, se généralise bientôt chez le public toujours à l'affût de la drogue merveilleuse qui amène le calme et l'oubli. Le malade habitué à utiliser ce médicament, est rapidement amené à en abuser, et une toxicomanie nouvelle s'établit ainsi peu à peu.

C'est ce qui se passe à l'heure actuelle avec les hypnotiques dérivés de la malonylurée, que l'on désigne souvent sous le nom générique de « Barbituriques ». Toutes les spécialités qui les renferment sont en grande faveur auprès du public, et leur nombre s'accroît chaque jour.

Il est facile de trouver les raisons de cet état de choses :

Le grand nombre de nerveux et de blessés du crâne laissés par la guerre, le besoin de calmer des nerfs tendus à l'excès par la vie trépidante de notre époque, le manque de sommeil, l'habitude maintenant acquise d'absorber un analgésique à la moindre manifestation douloureuse...

Quoi qu'il en soit, l'hypnotique né d'hier, connaît aujourd'hui une vogue énorme, puisqu'il apporte à l'homme ces deux choses si précieuses : le repos et l'oubli.

A côté des accidents chroniques du barbiturisme, que les médecins relatent quotidiennement et qui relèvent de la psychiatrie, des intoxications aiguës par abus ou tentative de suicide, sont de jour en jour plus nombreuses.

Le secours de l'opium étant interdit par des lois de plus en plus rigoureuses, les nerveux, les anxieux, les toxicomanes, les désespérés de la vie, tous les « laudanisants », se sont jetés sur ces nouveaux produits, répandus par une publicité habile, et accessibles à tous.

Que ce soit pour des raisons passionnelles ou en conséquence d'un état morbide, le besoin d'en finir avec la vie se traduit très souvent à l'heure actuelle par l'absorption d'une certaine dose de ces soporifiques, qui vous mènent doucement dans l'autre monde, sans bruit et sans souffrance, par cette voie euthanasique si tentante.

C'est le nombre croissant de ces suicides et de ces toxicomanies aussi bien que l'envahissement de la pharmacopée par les dérivés barbituriques, qui nous a amené à entreprendre quelques recherches sur la toxicologie de ces corps.

Nous avons réparti notre travail de la façon suivante :

I. — Historique et revue générale des différents dérivés barbituriques connus.

II. — Propriétés générales de ces dérivés.

III. — Technique de recherche toxicologique. Discussion des différentes méthodes.

IV. — Elimination urinaire.

V. — Fixation sur le sang chez l'homme et chez le lapin.

VI. — Fixation sur le cerveau. Essai de localisation cérébrale.

VII. — Résistance à la putréfaction.

VIII. — Conclusions.

Avant d'entreprendre l'exposé de ces recherches nous tenons à remercier M. le professeur Guerbet pour l'accueil si bienveillant que nous avons trouvé dans son laboratoire, et pour l'honneur qu'il nous a fait d'accepter la présidence de cette thèse.

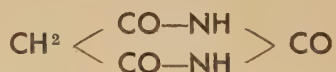
Nous remercions aussi M. le professeur Herissey et M. le professeur agrégé Fabre qui nous ont fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Nos remerciements tout spéciaux vont à M. Cheramy, Pharmacien des Hôpitaux, assistant du cours de Toxicologie, pour l'intérêt avec lequel il a suivi nos recherches, et les conseils qu'il nous a prodigués.

CHAPITRE PREMIER

Historique et revue des principaux dérivés barbituriques

En 1903, E. Fischer et Von Mering (16) faisant réagir l'urée sur l'éther malonique, obtinrent la malonylurée ou acide barbiturique de formule :



La formation de ce nouveau groupement hypnogène venait couronner tous les espoirs que Fischer fondait sur les uréides parmi lesquels figuraient déjà l'uréthane, ou carbamate d'éthyle, et l'hédonal ou méthylpropylcarbinol-uréthane.

On assista alors à une véritable éclosion de dérivés hypnotiques. Leur nombre déjà imposant s'est particulièrement accru au cours de ces dernières années.

En fixant sur le noyau de l'acide barbiturique différents radicaux : CH^3 , C^2H^5 , C^3H^5 , C^6H^5 , Cl, Br. on modifie ou renforce les actions hypnotiques initiales.

Les groupements d'additions hypnophores sont en effet plus ou moins actifs, selon leur nombre d'atomes de carbone, leur position symétrique ou dissymétrique. Alors que le groupement méthyle (CH^3) est sans action, le groupement éthyle (C^2H^5) est manifestement actif.

Cette propriété va s'accroissant jusqu'au dérivé allylé, puis devient très faible avec le composé diisoamylé.

On constate d'autre part (Carnot et Tiffeneau) (6), que le

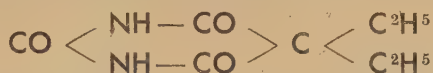
pouvoir hypnotique des dérivés disubstitués asymétriques est plus élevé que celui des disubstitués symétriques.

On verra dans la liste que nous donnons des principaux uréides cycliques en usage actuellement, qu'à part trois uréides symétriques : Véronal, Dial et Proponal dont les deux premiers seulement sont employés, tous les autres sont des dérivés asymétriques.

Ce sont suivant leur ordre sensiblement chronologique d'entrée dans la thérapeutique :

L'acide *diethylbarbiturique* (Véronal-Barbitone)

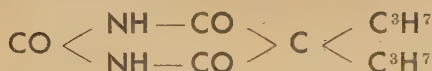
P.F. 190°-191°



(Le diethylbarbiturate de codéine se nomme Codeonal.)

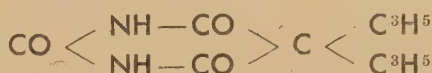
L'acide *dipropylbarbiturique* (Proponal)

P.F. 145°



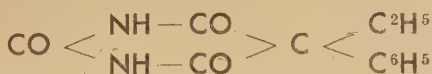
L'acide *diallylbarbiturique* (Dial)

P.F. 170°-171°



L'acide *phénylethylbarbiturique* (Gardénal. Luminal)

P.F. 170°-172°



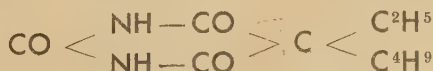
L'acide *méthylphenylbarbiturique* (Rutonal)

P.F. 220°



L'acide *butylethylbarbiturique* (Soneryl. Néonal)

P.F. 123°



L'acide *allylisopropylbarbiturique* (546 Roche, Numal)

P.F. 137°



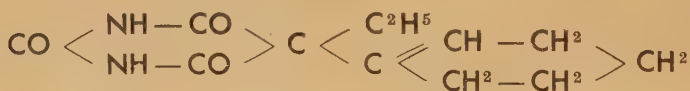
surtout employé en combinaison avec le pyramidon sous le nom d'*Allonal* (Roche) P.F. 93° ou Allylisopropylbarbiturate de Pyramidon.

On emploie également :

L'acide *Ethylisopropylbarbiturique* dont le sel de calcium porte le nom d'*Ipral*.

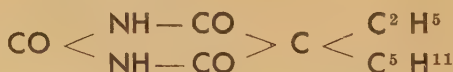
L'acide *cyclohexenylethylbarbiturique* (Tétrahydrogardénal. Phanodorme)

P.F. 173°



L'acide *isoamylethylbarbiturique* (Amytal)

P.F. 155°



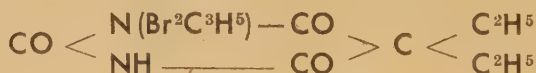
L'acide *isobutylallylbarbiturique* (Sandoptal Sandoz)

P.F. 137°-138°



L'acide *dibromopropyldiethylbarbiturique* (Diogénal)

P.F. 126°



L'acide *bromopropenylisopropylbarbiturique* (Noctal)

P.F. 178°



L'acide *bromopropenylbutylbarbiturique* (Pernoctone)

P.F. 130°-132°



CHAPITRE II

Propriétés générales des dérivés barbituriques

Nous passerons successivement en revue leur action physiologique, leur action toxique, leurs propriétés physiques et chimiques, et leurs différentes réactions caractéristiques.

I. — ACTION PHYSIOLOGIQUE.

A/ Syndrome général;

B/ Diagnostic;

C/ Indications thérapeutiques.

L'hypnotique le mieux étudié, le plus connu de la série est le premier en date : le véronal.

Son étude toxicologique a été le sujet de plusieurs thèses particulièrement en France de A. Tardieu (43) et G. Pissot (32). Le premier auteur donne un tableau très éloquent de nombreuses observations d'intoxications aiguës par le Véronal qui ont évolué les unes vers la mort, les autres vers la guérison complète. Ce tableau exprime clairement l'extrême variabilité de la dose mortelle de l'acide diéthylbarbiturique. « Elle oscille, dit-il, entre 1 et 14 gr., avec une bien plus grande fréquence au-dessus de 5 grammes. »

Pour les autres dérivés barbituriques les plus couramment employés : Gardénal, Dial, Somnifène, Soneryl, si l'on peut dire que la dose thérapeutique oscille entre 0 gr. 10 et 0 gr. 30, la dose toxique est extrêmement variable comme pour le Véronal. Ces dérivés sem-

blent bien contrindiqués chez les hépatiques (Tardieu) et les cardiorénaux. Leur étude pharmacologique a été faite sur le poisson par Broun (3-4), qui a montré, comme nous le disions plus haut, que le pouvoir narcotique croît avec le nombre d'atomes de carbone, aussi bien en série ramifiée qu'en série linéaire. Toutefois les isomères à chaîne ramifiée, sont moins actifs que les isomères correspondants à chaîne linéaire. De plus, il a constaté que le radical non saturé allyle, confère un pouvoir hypnotique plus intense que ne le fait le radical saturé correspondant.

On a remarqué depuis longtemps que la théorie du coefficient de partage de Meyer et Overton :
$$\frac{\text{sol. dans l'huile}}{\text{sol. dans l'eau}} = K$$

qui sert à apprécier la valeur d'un anesthésique, s'applique également aux dérivés barbituriques. Leur pouvoir narcotique est inversement proportionnel à leur solubilité dans l'eau, exception faite toutefois pour quelques séries ramifiées.

A. — Syndrome général de l'intoxication barbiturique. —
Dans une étude clinique détaillée, qui n'est pas de notre ressort, il y aurait lieu de distinguer divers degrés selon la gravité ou la légèreté de l'intoxication (Barbiturisme aigu ou chronique). Les observations abondent dans les revues médicales, nous ne donnerons ici que les signes les plus typiques de l'évolution de l'intoxication barbiturique, que nous avons pu observer avec notre distingué ami le Docteur Tardieu, dans le service de M. le docteur Trémolières à l'Hôpital Boucicaut.

Toutes les tentatives de suicides provenaient d'une absorption du toxique, *per os*; nous laisserons donc de côté l'action par injection intramusculaire ou intraveineuse chez l'homme qui est du domaine de la clinique.

Les premiers symptômes apparaissent environ 1/2 heure après l'absorption du toxique. Les prodromes que l'on peut constater sont de courte durée : Vertiges avec titubation, nausées, agitation très nette avec certains dérivés (Le Guillant), excitation et véritable état ébrieux (Schlafrauch) (Kraft, Ebing, Tardieu). Les vomissements sont très rares.

Le malade entre alors rapidement dans un coma plus ou moins

profond. Il peut être léger, le malade répondant à l'appel de son nom, et prononçant quelques paroles sans suite, quand on le tire de sa torpeur. La plupart du temps le coma est si profond qu'aucune excitation même violente ne peut réveiller le malade. La résolution musculaire est alors complète.

Le malade respire lentement, profondément. La respiration stertoreuse est plus rare. Les réflexes sont abolis. Les pupilles sont le plus souvent en mydriase. Le pouls est régulier, plutôt faible. Les réflexes cornéens et pharyngiens sont absents.

On observe fréquemment des troubles sphinctériens. Quelquefois incontinence, le plus souvent rétention urinaire. Pendant toute la durée du sommeil la recherche de l'hypnotique dans l'urine est toujours positive. Celle-ci est souvent fort colorée, ce qui montre l'atteinte de la cellule hépatique (présence de pigments *biliaires* et forte proportion d'urobiline). L'urée dans le sang peut être augmentée. La recherche de l'hypnagogue dans le liquide céphalo-rachidien est positive au début du coma.

La température peut être légèrement élevée. La mort, si elle survient, semble être hâtée par des complications cardio-rénales et broncho-pulmonaires.

Le coma cessant, si la guérison se produit, on remarque chez l'intoxiqué tout un ensemble de signes, marquant l'imprégnation des centres nerveux par le toxique. Ils sont très variables d'un malade à l'autre. On remarque de la dysarthrie, des troubles de la mémoire, de la dysmétrie. Les signes oculaires les plus fréquents sont la diplopie et le nystagmus. Les troubles cutanés, fréquemment observés, sont des érythèmes polymorphes, ils sont presque toujours prurigineux.

B. — Diagnostic. — Il ne semble pas y avoir de différences notables entre les différents dérivés de la malonylurée, leurs effets sont à peu près identiques.

La première des choses à faire est de sonder le malade et de rechercher le toxique dans l'urine, ce qui permet un diagnostic très rapide. Sur le cadavre on fait les prélèvements habituels, en se rappelant que, comme M. Fabre l'a prouvé, ce sont les centres nerveux qui peuvent retenir la plus grande partie de ces composés.

C. — **Indications thérapeutiques.** — Le lavage d'estomac est toujours indiqué quoique souvent trop tardif et impraticable.

En tous cas il faut réchauffer le malade aux extrémités, et pratiquer une saignée abondante de 500 à 600 cc. (Tardieu) justifiée par la fixation des barbituriques sur le sang et les hématies en particulier (Fabre). La strychnine et la caféine sont indiquées, pendant toute la durée du coma.

II. — PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

Les dérivés disubstitués de la malonylurée se présentent sous l'aspect de petits cristaux blancs ou de poudres microcristallines.

Nous avons donné plus haut leurs différents points de fusion avec leurs formules développées.

Ils se subliment facilement, bien au-dessous de leur point de fusion, et quelques-uns même au-dessus, sans se décomposer (véronal).

Ils sont peu solubles dans l'eau froide, d'autant moins que l'on s'élève dans la série. Plus solubles à chaud.

Facilement solubles dans l'éther, l'éther acétique et l'acétone, qui sont les solvants de choix avec l'alcool chaud. Moins dans l'alcool froid, le chloroforme, l'acide acétique, le tétrachlorure de carbone, la ligroïne, la benzine, pratiquement insolubles dans l'éther de pétrole.

La soude au 1/10 les dissout instantanément. L'acide acétique les précipite de leurs solutions, mais en excès il peut les redissoudre.

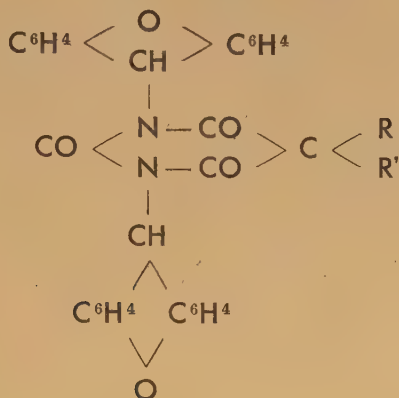
Le carbonate de soude les dissout bien. Le bicarbonate beaucoup moins, ou même pas du tout (Dial).

La *diéthylamine* les dissout également, quoique base faible. Elle sert de solvant pour les dérivés injectables (Somnifène).

Ils donnent un dégagement très net d'ammoniaque par une ébullition prolongée avec une solution de soude suffisamment concentrée (au 1/2).

Ils précipitent tous par le réactif de Millon.

Ils se combinent avec le xanthidrol, pour donner des dérivés dixanthylés (Fabre, 13) de formule générale qui peuvent servir à les identifier (1).



Pour préparer les dérivés xanthylés, on opère de la façon suivante :

0 gr. 05 de produit dissous dans 0 cc. 5 d'acide acétique, additionnés de 0 gr. 10 de xanthidrol sont portés à l'ébullition quelques instants. Par refroidissement, il se forme un précipité cristallin abondant. Après quelques heures on l'essore, lave à l'alcool bouillant, pour éliminer l'excès de dérivé barbiturique et de xanthidrol. On le fait recristalliser dans la benzine, on sépare les cristaux, on les sèche et l'on prend le point de fusion instantané au Bloc Maquenne.

A. — Réactions microchimiques et combinaisons métalliques.

— Les microréactions ont été spécialement étudiées par MM. Van Itallie et Van der Veen (49) sur le Véronal, Luminal, Rutonal et par M. Isnard sur le Dial et le Gardénal (24).

Ces auteurs ont décrit minutieusement les cristaux particuliers obtenus par l'action sur leurs solutions sodiques ou ammoniacales, de bichromate de potassium, phosphate d'ammonium, acétate de plomb, nitrate de Thallium, nitrate d'argent ammoniacal.

On connaît depuis longtemps les combinaisons mercuriques et argentiques des barbituriques. Une étude approfondie en a été faite

(1) Voici les différents points de fusion avec quelques constantes des dérivés que l'on rencontre le plus souvent en thérapeutique :

en France par Fleury (18), et en Allemagne par Rupp et Müller (38) [Précipitation par le sulfate mercurique et le Chlorure mercurique (spécifique du groupe allyle)].

Nature des deux substituants	Nom commercial	Poids moléculaire	Point de fusion	Point de fusion au dérivé xanthyle	Solub. dans l'eau en gr. par litre à 17°.20°
Diethyle.....	Véronal	184	190°-191°	245°-246°	6.9
Phénylélhyle..	Gardénal Luminal	232	172°-173°	218°-219°	0.86
Butylethyle....	Soneryl	212	127°	242°-243°	2.6
Isopropylalyle	Numal	210	138°	221°	3.9
Diallyle	Dial	208	171°	242°-243°	1.6

Dernièrement, en 1927, E. et I. Keeser (25) ont préparé des complexes ferriques de Gardénal et de Dial par simple ébullition avec une solution bouillante de perchlorure de fer.

Ces complexes contiendraient une molécule de fer pour trois molécules de gardénal ou de Dial. De tels produits présentant un très haut intérêt pour la recherche histologique des barbituriques dans le cerveau, nous avons essayé d'en préparer. Il nous a été impossible malgré tous nos efforts d'obtenir des complexes répondant aux caractéristiques données par ces auteurs.

Nous reviendrons plus loin sur cette question.

B. — **Réactions colorées.** — Elles sont nombreuses mais aucune n'est réellement spécifique.

Les dérivés barbituriques donnent des colorations variables avec les réactifs suivants :

Acide sulfurique

Acide sulfurique formolé (Marquis)

Réactif sulfophénique

Réactif de Mandelin

Solution d'iode (Guyot)

Réaction de W. Parri (Véronal, soneryl, dial, gardénal) (30).

— Dix centigrammes du produit dissous dans 5 cc. d'alcool à 90°

additionnés de X gouttes de solution d'azotate de Cobalt puis goutte à goutte d'ammoniaque, donnent une coloration rouge violacée intense.

Réaction de Ranwez (réaction du groupe phényl) (34). — Dix centigrammes de produit portés au B.M. pendant dix minutes avec le mélange de 2 cc. d'acide sulfurique et de 0 gr. 50 de nitrate de potassium puis additionnés de 10 cc. d'eau distillée donnent un liquide jaune, qui se trouble par refroidissement et laisse déposer un précipité cristallin. En saturant d'ammoniaque, le précipité se dissout et le liquide prend une couleur jaune foncée.

La présence de ce même groupe phényle dans ces dérivés leur confère une réaction de Guerbet-Clark positive.

Réaction de Guerbet-Clark. — On traite à chaud quelques centigrammes de produit par V gouttes d'acide azotique fumant. On alcalinise par la lessive de soude diluée, ajoute 0,10 d'hydrosulfite de soude solide, fait bouillir jusqu'à disparition de l'odeur d'acide sulfureux. On refroidit, ajoute X gouttes de solution d'azotite de sodium au 1/1.000; q.s. d'ammoniaque, puis X gouttes de solution ammoniacale de naphthol B. On obtient une belle coloration rouge.

Ekkert (10) a montré que l'acide sulfurique concentré en présence d'aldéhyde salicylique, donnait une coloration rouge avec le Véronal, le Gardénal et le Proponal.

Il différencie le Gardénal du Véronal et du Proponal par l'action de l'acide sulfurique formolé qui donne au B.M. avec le premier (Gardénal) une coloration rose, cyclamen, puis rouge vineux.

Au cours de nos recherches sur les réactions colorées des différents barbituriques nous avons découvert une réaction propre au dérivé diallylé.

C. — **Nouvelle réaction colorée du Dial.** — Si l'on place sur un verre de montre quelques petits cristaux de Dial en présence de réactif sulfovanillique à 1/100 récemment préparé, et que l'on chauffe quelques minutes sur le couvercle du B.M., on voit apparaître de belles stries rouge cerise.

Cette réaction est positive avec des traces infimes de Dial. Avec 0 gr. 01 à 0 gr. 02 de Dial la réaction peut se faire dans un

tube, on ajoute quelques gouttes d'alcool et le réactif sulfovanillique goutte à goutte. La zone de contact se colore en rouge cerise et si l'on agite, tout le mélange prend une teinte groseille.

Cette réaction a l'avantage de se faire en présence d'eau, d'alcool et d'éther. Le réactif doit toujours être en grand excès par rapport au solvant de façon à ne pas diluer par trop l'acide sulfurique. En milieu trop dilué, en effet, la réaction ne se produit pas. En présence d'un excès d'alcool il se produit une coloration verdâtre qui change la teinte initiale.

Cette réaction est due au groupement allyle. Avec l'alcool allylique en solution dans l'eau elle est positive jusqu'à 1/10.000.

Il est à remarquer toutefois que le Numal (allylisopropyl-malonylurée) ne donne pas cette réaction. Un radical allyl n'est ici pas suffisant pour provoquer une coloration même à chaud.

Cette réaction du Dial ne peut être considérée comme spécifique, puisque le réactif sulfovanillique donne des colorations avec différents corps organiques (les terpènes et les phénols principalement), mais elle peut être utile pour différencier le Dial des autres barbituriques.

CHAPITRE III

Technique des recherches toxicologiques

I. — RECHERCHE TOXICOLOGIQUE, METHODES D'EXTRACTION.

Nous envisagerons les différentes méthodes d'extraction des dérivés barbituriques proposées par les auteurs. Nous exposerons les difficultés que nous avons rencontrées au cours de celles-ci, et les modifications que nous avons employées selon l'organe envisagé.

1°. — DANS LES VISCERES EN GENERAL.

a) La méthode classique de recherche toxicologique est la méthode générale de Stas-Otto-Ogier.

Les viscères, finement broyés au hachoir universel, sont épuisés à chaud par l'alcool tartrique. Après évaporation de l'alcool et plusieurs reprises du résidu par l'alcool absolu, l'extrait aqueux acide est purifié par le pétrole léger, et épuisé ensuite par l'éther sulfurique toujours en milieu acide. Les barbituriques passent en solution éthérée.

L'évaporation de l'éther laisse les dérivés barbituriques plus ou moins bien cristallisés. On les soumet à diverses purifications que nous envisagerons plus loin.

b) M. FABRE (15) a préconisé une digestion préalable de la pulpe d'organe par la pancréatine. Voici la technique qu'il emploie :

« Les organes convenablement pulpés sont délayés dans cinq
« parties d'eau distillée, et le mélange est porté à l'ébullition quel-
« ques instants. On laisse refroidir à 50°-55°, et le produit trans-
« vasé dans un flacon à large ouverture, est soumis à l'action de la
« pancréatine ajoutée au mélange dans la proportion de 1 gramme
« pour cinquante grammes de pulpe. Après un séjour de 10 à 12
« heures dans l'étuve à 50°-55° la protéolyse est pratiquement com-
« plète. On porte à l'ébullition et l'on sépare le résidu par centri-
« fugation ou filtration. Le liquide ainsi obtenu, parfaitement lim-
« pide, est traité en milieu acide par l'éther, soit par agitation, soit
« au moyen de l'appareil à épuisement continu de MM. Fayolle
« et Lormand, sans qu'il y ait à craindre d'émulsions tenaces, comme
« on en observe fréquemment au cours de manipulations de cette
« nature. »

L'auteur s'est assuré que l'action de la pancréatine sur le véronal était nulle, il insiste sur l'ébullition avant l'attaque trypsique, nécessaire pour détruire l'antitrypsine qui s'opposerait à la protéolyse. Cette remarque a toute sa valeur pour des viscères ou du sang frais qui n'ont pas encore subi la fermentation putride.

MM. Van Itallie et A. D. Stenhauer (48) recommandent de s'adresser comme solvant à l'éther acétique plutôt qu'à l'éther ordinaire, particulièrement pour le véronal, qui est beaucoup plus soluble dans le premier que dans le second. Cet avantage est bien amoindri par le fait que l'on obtient avec l'éther acétique des émulsions beaucoup plus tenaces qu'avec l'éther ordinaire.

La méthode de Fabre a l'avantage d'être rapide et élégante. Elle donne un liquide qui filtre facilement et qui se prête aisément aux épuisements. Elle n'est pourtant pas sans présenter quelques inconvénients au premier abord.

On opère à chaud, en milieu aqueux dilué, ce qui charge le liquide d'épuisement d'une grosse quantité d'impuretés, qui seraient insolubles dans l'alcool.

Nous avons remarqué qu'il se forme souvent un coagulum, provenant sans doute d'une protéolyse incomplète, quand on porte à l'ébullition le liquide de digestion. D'autre part, lors de l'acidification du liquide refroidi, il se produit parfois un précipité volumineux

dont le lavage est difficile et qui risque de causer des pertes, principalement si l'on a opéré en solution assez concentrée. Il importe donc d'opérer en milieu suffisamment dilué et d'acidifier avec précaution.

Nous avons employé cette méthode avec succès pour rechercher les dérivés barbituriques dans le sang ou les viscères de malades ou d'intoxiqués, dans le service de M. le docteur Trémolières à l'hôpital Boucicaut, qui a bien voulu s'intéresser à notre travail, et nous fournir avec son assistant, M. le docteur Tardieu, la matière première en vue de nos recherches.

En appliquant cette méthode concurremment avec la méthode d'Ogier, à l'alcool tartrique, nous avons toujours obtenu des résultats concordants.

Nous avons pratiqué également des essais de rendements comparatifs de ces deux méthodes, en partant de quantités connues de Véronal et de Gardénal. La méthode de protéolyse pancréatique nous a donné des résultats du même ordre, quoique un peu plus faibles.

Première expérience. — A 200 grammes de foie de bœuf pulvé on ajoute 0 gr. 100 de *Véronal* finement pulvérisé, on mélange soigneusement, on met trois jours à l'étuve à 37°, en remuant le plus souvent possible, dans un cristalliseur couvert pour éviter la dessiccation. Au bout du troisième jour on partage le produit en deux parties égales, et l'on pratique sur la première portion l'extraction par la méthode de Fabre et sur la deuxième par la méthode d'Ogier. On obtient les résultats suivants :

	Quantité	Rendement
1° Méthode de Fabre	0 gr. 078	78 %
2° Méthode d'Ogier	0 gr. 0768	76,8 %

Deuxième expérience : A 200 grammes de foie de bœuf pulvé on ajoute 0 gr. 100 de *Gardénal*, on laisse trois jours à l'étuve à 37°, en agitant fréquemment.

L'extraction pratiquée comme ci-dessus, sur les deux portions, donne les résultats suivants :

	Quantité trouvée	Rendement
1° Méthode de Fabre	0 gr. 074	74 %
2° Méthode d'Ogier	0 gr. 073	73 %

Difficultés rencontrées au cours de ces méthodes. — Dans l'extraction à l'éther pratiquée sur les viscères par l'une ou l'autre de ces deux méthodes, ce qui est le plus à craindre ce sont les émulsions tenaces, particulièrement lorsqu'on opère sur le foie, le cerveau et le sang.

D'autre part les acides barbituriques se fixent fortement sur les lipoides du foie et du cerveau et il est très difficile de les extraire en totalité.

Nous avons pratiqué une expérience « in vitro » pour nous rendre compte des erreurs, auxquelles on s'expose, dans l'extraction des viscères riches en lipoides.

On prend une solution éthérée de lipoides de foie provenant d'une recherche toxicologique antérieure et privée de barbituriques. On évapore l'éther. Au résidu de graisses, du poids de 20 grammes environ, on ajoute 0 gr. 20 de Dial finement pulvérisé; on agite et mélange à plusieurs reprises, on laisse en contact une semaine dans une étuve à 37°.

Au bout de ce temps, on pratique une extraction au réfrigérant à reflux par l'alcool fortement tartrique; après une demi-heure d'ébullition on ajoute un volume d'eau distillée égal au volume d'alcool primitif. On fait bouillir à nouveau deux heures au réfrigérant à reflux, de telle sorte que l'ébullition soit toujours tumultueuse, afin d'obtenir un bon brassage et partant un bon épuisement de la graisse qui surnage, On laisse refroidir 24 heures. Au bout de ce temps on sépare le gâteau de graisse durci. On filtre la solution hydro-alcoolique qui passe généralement bien limpide. On épuise alors directement dans une ampoule à décantation, à trois reprises, par l'éther. On

dessèche l'éther sur du sulfate de soude anhydre, on filtre, on évapore. Le résidu cristallin est repris une ou deux fois par l'eau au B.M. en présence de charbon de sang, on filtre, concentre et laisse cristalliser.

On obtient ainsi :

0 gr. 126 de Dial

On n'a donc pu extraire que :

63 % du Dial existant dans les lipoïdes de foie.

La proportion qui reste fixée à l'état de combinaison lipoïdique s'élève à 37 % environ, si l'on néglige les pertes au cours de l'expérience.

Foie. — La première des choses à faire lorsqu'on s'apprête à pratiquer une extraction sur un foie est d'enlever soigneusement la vésicule biliaire, si toutefois sa recherche est possible.

Lorsque l'état de putréfaction est avancé, la vésicule éclate, et la bile se répand dans tout l'abdomen. Les acides et les sels biliaires passeront donc en solution dans l'alcool et dans l'eau. Comme la bile a un très grand pouvoir émulsionnant, si l'on pratique l'extraction par agitation dans une ampoule à décantation, on obtient des émulsions persistantes très difficiles à détruire, qui allongent considérablement la technique, même si l'on a à sa disposition des centrifugeuses de gros calibre.

Nous avons essayé de saturer la solution à épuiser par divers sels neutres : Cl Na , $\text{SO}^4 \text{Na}^2$, $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$.

Mais outre que ces sels ne réussissent pas à empêcher les émulsions, ils ont l'inconvénient de se précipiter en partie, quand on agite la solution avec le solvant volatil.

Nous avons essayé de déféquer la liqueur avec l'acétate basique ou neutre de plomb, mais l'abondant précipité obtenu en pareilles conditions, expose à de fortes pertes. Dans des essais que nous avons pratiqués, nous avons observé des pertes variant de 40 à 50 %.

Comme nous tenions à éliminer la bile responsable des émulsions, nous nous sommes adressés, sur le conseil de M. Cheramy, à un réactif qui la précipite : le *Chlorure de Baryum*.

Dans le résidu d'évaporation de l'alcool on ajoute goutte à goutte en agitant, une solution de chlorure de baryum à 10 % jusqu'à cessation du précipité; on laisse reposer quelques instants, et on filtre.

Le liquide est éclairci sensiblement, la majeure partie des produits émulsionnants se sont précipités avec les taurocholates et glycolates de baryum mélangés à des savons de baryte, et il ne reste plus qu'à éliminer le baryum en excès par l'acide sulfurique dilué au 1/10 ajouté goutte à goutte jusqu'à cessation de précipité. On filtre et épuise à l'éther.

Nous nous sommes assurés auparavant que, d'autre part, le chlorure de baryum ne *précipitait pas les solutions d'acides barbituriques*, et que l'élimination du baryum par l'acide sulfurique n'entraînait pas avec le précipité de sulfate de baryum des quantités sensibles d'hypnotique.

Nous avons donc dissous dans différents vase à précipitation renfermant chacun 50 cc. d'eau distillée 0,10 de chacun des différents barbituriques usuels, soit : 0,10 de Véronal - 0,10 de Dial - 0,10 de Soneryl - 0,10 de Numal (isopropylallyl). La solution est faite à chaud. On laisse refroidir, on ajoute goutte à goutte 1 cc. de solution de chlorure de baryum à 10 %. On n'observe aucun louche avec aucun des dérivés précités, même après plusieurs heures. On précipite alors complètement le baryum par l'acide sulfurique dilué, en ne donnant au liquide qu'une légère acidité. On laisse reposer. On filtre après lavage du filtre. On épuise trois fois le filtrat acide avec de l'éther. Par évaporation de cet éther on récupère presque intégralement les 0,10 d'hypnotique dont on est parti.

Les pertes au cours des manipulations ne dépassent pas 2 à 3 %.

Sang. — L'extraction des dérivés barbituriques du milieu sanguin est une des plus délicates. On a en effet un milieu liquide riche en substances protéiques solubles à la fois dans l'eau et dans l'alcool faible.

Si l'on opère suivant Stas-Otto-Ogier, en additionnant le sang d'alcool tartrique, et que l'on pratique l'épuisement au B.M. avec

un réfrigérant à reflux, on obtient, par refroidissement, une masse visqueuse impossible à filtrer, même à la trompe, masse d'autant plus gélatineuse que l'on a employé moins d'alcool à titre élevé.

Si l'on opère à basse température (50° environ), l'épuisement est mauvais car les caillots sont mal pénétrés.

De toutes façons, que l'on opère sur le sang total, ou isolément sur le sérum et sur les globules, la technique de M. Fabre est toujours plus rapide ; elle homogénise rapidement le milieu et évite l'emploi d'une grosse quantité d'alcool absolu.

Pour obtenir un bon rendement par l'une ou l'autre de ces méthodes il importe d'abord de diviser finement le caillot, afin que les globules puissent être intimement pénétrés, soit par l'alcool, soit par la trypsine au cours de la digestion pancréatique. Nous pratiquons cette division en broyant le caillot dilacéré au mortier avec du sable lavé.

Dans la méthode de Stas-Otto-Ogier nous ajoutons directement l'acide tartrique granulé et le sable sur le caillot, mélangeons et ajoutons l'alcool par petites portions en agitant.

Nous avons obtenu de bons résultats dans la méthode de Fabre, en saturant par le sulfate d'ammoniaque le liquide soumis à l'ébullition après l'action de la pancréatine. Le précipité formé est séparé par filtration. On a ainsi précipité les albumoses, rendu le milieu plus dense, donc plus facile à épuiser à l'éther, et moins susceptible de précipiter par addition d'acide.

Cerveau. — Le cerveau étant très riche en lipoides et en cholestérine les liquides d'extraction aqueux ou alcooliques sont laiteux par suite de l'émulsion des matières grasses, des lipoides et de la cholestérine.

M. Fabre recommande en pareil cas de centrifuger, d'acidifier légèrement et d'agiter avec un peu de chloroforme qui détruit l'émulsion. « Après centrifugation et lavage à l'eau, dit-il, on obtient un liquide pouvant être soumis, sans crainte d'émulsion et de pertes sensibles, à l'action des solvants. »

Lorsqu'on opère sur de grosses quantités de viscères la centrifugation est mal commode, et l'on n'a pas toujours à sa disposition une centrifugeuse d'un calibre suffisant.

Dans ce cas nous avons pratiqué une double purification, en milieu acide par l'éther de pétrole, et en milieu alcalin par l'éther.

Nous avons d'abord vérifié les solubilités des principaux barbituriques employés dans l'éther de pétrole.

Le Véronal peut être considéré comme pratiquement insoluble.

Pour les autres, tels que Gardénal, Dial, Soneryl, Isopropylalyl-, la solubilité est toujours inférieure à 0gr. 001 %, donc négligeable.

L'extrait tartrique suivant Stas-Otto-Ogier est agité avec un excès d'éther de pétrole. On laisse reposer, on décante : le solvant entraîne la majeure partie des acides gras, graisses lipoides et cholestérols. On alcalinise alors faiblement par la soude diluée, et on pratique un épuisement à l'éther ordinaire qui complète la purification. La solution alcaline retient les dérivés barbituriques à l'état de sels de soude et n'abandonne rien à l'éther.

La deuxième séparation se fait bien, car l'éther détruit les émulsions résiduelles provoquées toujours, même en milieu acide, par l'éther de pétrole.

Cette méthode de double purification a été largement employée dans nos recherches sur les localisations cérébrales dont nous parlerons plus loin.

Urine. — De toutes les recherches l'extraction des barbituriques de l'urine est la plus efficace, la plus probante et la plus rapide.

Depuis l'emploi des premiers dérivés de malonylurée et particulièrement du Véronal, elle a fait le sujet d'un grand nombre de travaux.

Les barbituriques sont en effet toujours éliminés en nature par l'urine. Le plus stable est le véronal, les autres : Gardénal, Dial, Numal sont en partie détruits mais on en trouve toujours une forte proportion intacte.

Une des premières choses à faire dans une expertise toxicologique, est donc de retirer soigneusement le contenu de la vessie pour le soumettre à l'analyse. Si l'intoxiqué est dans le coma, on doit le sonder immédiatement, on trouve encore l'hypnotique dans l'urine alors qu'il n'y en a plus dans le sang, et sa recherche est autrement plus facile et plus rapide.

L'élimination urinaire des barbituriques a fait l'objet de travaux abondants. Parmi les principaux auteurs citons en France MM. R. Fabre (12-13), R. Fabre et P. Fredet (14-15), P. Fleury et Guinnebault (19), M. Delepine (7), Van Itallie et A. Steenhauer (48), Kohn Abrest (loc. cit.), Pissot (32), Tardieu (43), en Allemagne E. Fischer et von Mering (16), Autenith (2), J. Halberkann et F. Reiche (21), H. Handorf (22) et M. Reinert (37).

M. Kohn Abrest concentre l'urine et la traite par l'alcool tartrique comme pour les viscères.

M. R. Fabre défèque au sous-acétate de plomb et épuise par l'éther en milieu acide.

MM. V. Itallie et Steenhauer défèquent à l'acétate neutre de plomb, et épuisent par l'éther acétique en milieu acétique.

De toutes façons l'extraction est simple et facile. Seule la purification est délicate. Il s'agit en effet d'obtenir un produit cristallisé suffisamment pur pour être caractérisé (P.F., action des différents réactifs).

La défécation au plomb a le grand avantage sur les autres méthodes, de donner d'emblée un liquide limpide. Certains auteurs ont prétendu que le précipité plombique pouvait entraîner des acides barbituriques.

Nous avons appliqué cette méthode à des urines auxquelles nous avons ajouté des quantités connues de Véronal, Gardénal et Dial, à des concentrations variables. Après 48 heures de contact nous avons retrouvé de 93 à 94 % du produit, ce qui est très acceptable en toxicologie.

Purification. — a) par l'eau en présence de charbon de sang.

La méthode la plus courante, celle qui est le plus souvent utilisée, est la reprise du résidu d'évaporation de l'éther par l'eau chaude au B.M. bouillant en présence de noir animal (charbon de sang) qui absorbe les impuretés. Tous les noirs animal ne conviennent pas pour cette opération. Nous avons employé pour nos expériences un noir décolorant que nous avons essayé au point de vue du degré d'absorption des barbituriques.

Une purification comprenant trois reprises par l'eau avec ce noir

animal n'a jamais occasionné de pertes de produit supérieures à 10 %.

En concentrant la solution aqueuse on obtient alors de beaux cristaux, ayant un point de fusion sensiblement fixe, facile à déterminer, et sur lesquels on peut faire l'essai des différents réactifs mentionnés plus haut.

2° *par le permanganate* : C'est la purification préconisée par MM. Van Itallie et A. S. Steenhauer.

Le résidu d'évaporation de l'éther acétique est dissous dans 10 cc. d'eau bouillante, on ajoute 5 cc. d'acide sulfurique dilué et une solution N/10 de permanganate de potassium, jusqu'à décoloration du liquide. L'oxyde de manganèse formé est décomposé par l'addition de quelques gouttes d'eau oxygénée, et on épuise le liquide par deux fois son volume d'éther acétique. On filtre, évapore et dessèche à + 100°.

3° *par précipitation à l'état de complexe mercuriel*. — Cette méthode a été employée par MM. Fleury et Guinnebault dans leurs recherches sur l'élimination du gardénal. Ils procèdent de la façon suivante.

L'urine (quantité de 24 heures ou partie aliquote) est additionnée, après mesure du volume, d'une solution saturée à froid d'acétate neutre de plomb, jusqu'à cessation de précipité. Dans le filtrat on précipite le plomb en excès par une solution saturée à froid de sulfate de soude. Le filtrat, acidifié exactement au rouge congo, est épuisé à l'appareil de Kubschen-Stendel environ 20 heures. Après lavage à l'eau, l'éther desséché sur du sulfate de soude anhydre est distillé, et le résidu chauffé sur B.M., est évaporé en soufflant avec une poire, jusqu'à ce que la masse d'abord visqueuse, soit devenue solide, et que l'odeur d'acide acétique soit complètement disparue. Le résidu, qui varie du jaune au brun foncé, est repris proportionnellement par 150 ou 200 cc. d'eau chaude, et filtré. On précipite les barbituriques du filtrat en ajoutant lentement et goutte à goutte une solution de sulfate mercurique (1).

Le précipité volumineux est centrifugé, et après plusieurs lavages à l'eau on ajoute quelques centimètres cubes d'acide chlorhy-

(1) On prépare cette solution avec 7 gr. de sulfate mercurique cristallisé dans 4 c.c. 5 de SO_4H_2 et eau q. s. p. 100 c.c. (Fleury).

drique dilué et on dissout dans environ 150 cc. d'eau. On fait barboter de l'hydrogène sulfuré dans une solution chaude, pour précipiter le mercure, on filtre, lave soigneusement à l'eau chaude, on épuise le filtrat à l'éther et on continue comme précédemment. Après pesée on identifie par le point de fusion.

Cette méthode scrupuleuse, donne toutes garanties d'exactitude et lorsqu'on pèse au bout de toutes ces longues opérations le produit final, on est certain de bien avoir isolé un dérivé barbiturique pur.

Pourtant l'expérience montre que plusieurs inconvénients viennent diminuer l'intérêt d'une technique si longue, et qui comporte tant de précipitations successives.

D'abord il faut prendre garde comme dans la méthode de Fabre que l'excès d'acétate de plomb soit faible, pour que le précipité de sulfate de plomb n'entraîne que des quantités négligeables de barbituriques.

La même remarque est valable lors de la précipitation du sulfure de mercure dans la liqueur chlorhydrique.

D'autre part, et c'est ici le point délicat de cette technique, des traces d'acide chlorhydrique ou de chlorures suffisent pour solubiliser la combinaison mercurique, ce qui nécessite un lavage rigoureux du premier extrait étheré et une déshydratation très poussée.

Le sulfate mercurique précipite également beaucoup de corps étrangers, la combinaison mercurique n'est donc pas toujours très pure ; en dernier ressort on est souvent obligé de reprendre le dernier extrait étheré par une petite quantité de noir animal, afin d'éliminer les quelques impuretés qui ont pu être entraînées.

Les pertes inévitables au cours de cette longue purification s'élèvent parfois jusqu'à 20 %, et si la méthode ordinaire de Fabre ne donne pas, pour une faible concentration, des rendements supérieurs, elle a l'avantage d'être plus simple et plus rapide.

C'est elle que nous avons employée dans nos recherches sur l'élimination du Gardénal et du Somnifène.

Elle n'est utilisable avec profit que lorsqu'on opère sur des urines relativement récentes et qui n'ont pas subi la fermentation ammoniacale. Dans les urines fermentées, au contraire, le précipité de plomb entraîne d'énormes quantités de barbituriques et il est très

difficile de se rendre compte de l'instant où l'on a atteint la dose opportune d'acétate de plomb; si bien que l'on en met trop ou trop peu, et en éliminant le plomb au sulfate de soude, on augmente encore la cause d'erreur.

Il y a lieu d'employer dans ce cas la technique d'Ogier et Kohn-Abrest à l'alcool tartrique, c'est celle dont nous nous sommes servis dans nos essais de résistance à la putréfaction de divers hypnagogues dont nous parlerons en dernier lieu.

4° *Par hydrolyse des dérivés xanthylés* : Fabre (12)

Nous avons indiqué parmi les propriétés chimiques des dérivés barbituriques leur faculté de donner avec le xanthydrogène en liqueur acétique des produits de condensation dixanthylés, nettement cristallisés et à point de fusion bien défini.

Cette propriété présente un grand intérêt pour la purification lorsqu'on a une quantité de produit de l'ordre du décigramme. Ces composées possèdent en effet la propriété de s'hydrolyser, en milieu chlorydrique, en régénérant le composé barbiturique. M. Fabre emploie l'alcool chlorydrique au 1/5, il opère de la façon suivante :

« Le dérivé dixanthylé est traité par 5 cc. d'alcool chlorydrique au 1/5 à reflux pendant une heure, il se dissout en donnant une liqueur vert foncé. On dilue dans 25 cc. d'eau distillée. Il se forme un abondant précipité incolore. On alcalinise par la soude au 1/10 qui en dissout une partie et en particulier le composé barbiturique libéré. On élimine par agitation à l'éther les parties insolubles constituées par du xanthone et des substances amorphes formées par la décomposition du xanthydrogène. Après trois traitements à l'éther, la liqueur alcaline est acidifiée à l'acide sulfurique dilué. Le véronal déplacé est dissous par trois épauvements à l'éther. La solution éthérée laisse par évaporation l'hypnotique à l'état pur dont on prend le point de fusion. »

5° *Par microsublimation*.

Dernièrement, A. Ehrismann et G. Joachimoglu (9) reprenant la technique pratiquée par E. et I. Keeser sur le cerveau, et que nous décrirons en détail à propos des localisations cérébrales, ont employé la microsublimation, avec un appareil électrique imaginé par eux, pour la recherche des dérivés barbituriques dans des urines

qui en renfermaient de faibles quantités (1 à 5 mg. %). Ils subliment à une température de 70 à 80° pour le Véronal et décèlent des quantités allant jusqu'à 0 mg. 5.

En résumé : nous avons employé au cours de nos travaux la méthode de digestion pancréatique de M. Fabre particulièrement pour le sang, en prenant soin de diviser finement le caillot et de saturer le liquide de digestion par le sulfate d'ammoniaque.

Pour les différents organes, la méthode de Stas-Otto-Ogier nous a donné de bons résultats en la modifiant par une défécation au chlorure de baryum particulièrement recommandable lorsqu'on opère sur le foie.

Pour le cerveau et les organes riches en graisses et lipoïdes nous pratiquons une double purification, en milieu acide par l'éther de pétrole, et en milieu alcalin par l'éther sulfurique.

Enfin la purification finale par le charbon de sang nous à toujours donné de bons résultats.

CHAPITRE IV

Élimination du dérivé barbiturique par les urines

RECHERCHE ET DOSAGE DES DERIVES BARBITURIQUES DANS LES URINES D'INTOXIQUES OU DE MALADES.

I. — **Généralités.** — Cette question est de beaucoup la mieux étudiée par les physiologistes et les toxicologues. Depuis que l'on a remarqué en effet que le véronal s'éliminait dans l'urine en nature, on a recherché son taux d'élimination ainsi que celui des autres dérivés barbituriques usuels (Dial, Gardénal, Somnifène, Soneryl, etc.).

Les travaux de Fabre, Fleury et Marc Reinert portent principalement sur l'élimination dans l'urine du chien, soit après injection intraveineuse, du dérivé soluble, ou absorption « per os » à l'aide de sonde stomacale.

L'absorption par la voie digestive, semble détruire ces hypnagogues en forte proportion, alors qu'administré par la voie intraveineuse, la plus grande partie est éliminée sans altération par l'urine.

Ainsi pour l'acide allylisopropyl-barbiturique, Marc Reinert ne décèle dans les urines que 15 % environ du produit absorbé, Fabre, en suivant l'élimination assez longtemps, en trouve après injection sanguine jusqu'à 90 %.

Nos recherches n'ont porté que sur l'élimination urinaire de l'homme et de la femme après absorption massive (intoxication) ou

d'ordre thérapeutique. Dans ce dernier cas les dérivés étudiés sont le Véronal, le Gardénal et le Somnifène, qui sont les hypnotiques les plus employés à l'heure actuelle dans les hôpitaux et asiles et même parmi le public.

Les premiers sujets ont été observés à l'hôpital Boucicaut, les autres à l'asile Sainte-Anne grâce à l'amabilité des docteurs Trémolières, Tardieu et Le Guillant que nous tenons à remercier bien vivement.

Technique d'extraction. — Parmi les nombreuses méthodes préconisées par les différents auteurs et exposées plus haut, nous avons choisi la méthode employée par Fabre (14).

« La totalité de l'urine émise en 24 heures est déféquée au
 « moyen du 1/10 de son volume de sous-acétate de plomb, le
 « mélange est filtré et le volume du filtrat exactement noté corres-
 « pond à une partie aliquote de l'urine totale. Après élimination du
 « plomb par une solution saturée de sulfate de soude, le liquide est
 « acidifié par addition d'acide chlorhydrique dilué. Le dérivé bar-
 « biturique est extrait à l'éther par trois épuisements successifs. Les
 « solutions éthérées desséchées sur du sulfate de soude anhydre sont
 « distillées à sec, le résidu est repris par l'eau distillé en présence
 « du noir animal. Après 30 minutes de digestion au B. M., la solu-
 « tion aqueuse est filtrée, le filtre convenablement lavé. La liqueur
 « est alors évaporée à sec dans un vase taré, et le résidu cristallin
 « est constitué par le composé cherché. Il est identifié par la
 « détermination du point de fusion et la préparation de son dérivé
 « xanthylé. »

Nous ne rapporterons ici que les résultats qui nous ont paru intéressants, soit que le malade ait succombé à son intoxication, soit que nous ayons étudié le rythme de l'élimination.

Premier cas : Intoxication suivie de mort (sept. 1929).

Malade N... Service du docteur Trémolières.

Cette malade nous a été amenée dans le coma. On l'avait trouvée chez elle dans cet état, étendue sur son lit. Les proches parlaient d'une intoxication mercurielle, pour avoir trouvé sur sa table de nuit un tube de comprimés de sublimé à 1 gr. à demi vidé.

On ne trouve pas de mercure dans ses urines et aucun signe clinique d'intoxication mercurielle.

La malade semblant dormir sous l'effet d'un hypnotique, on pense de suite à une intoxication par les dérivés de la malonylurée.

Un sondage effectué à la 20^e heure environ après l'intoxication donne 138 c.c. d'urine concentrée, d'une teinte ictérique, trouble, déposant rapidement par refroidissement et se recouvrant d'une pelli-cule de fins petits cristaux que nous avons toujours remarqué dans les urines de gros intoxiqués par les barbituriques. De ces 138 c.c. on extrait après trois purifications sur noir animal 0 gr. 167 d'un produit cristallisé fondant à 188°-190°.

Son dérivé xanthylé fond à + 245° — 246°.

Nous sommes donc en présence d'une intoxication par le Véronal.

La teneur par litre d'urine était de 1 gr. 21.

Un deuxième sondage fut effectué le lendemain à 10 h. du matin. On recueillit 140 c.c. d'urine plus foncée légèrement albumineuse. On put en extraire :

0 gr. 128 de Véronal fondant à 188°-190°.

Ce qui correspondait à une teneur par litre de 0 gr. 91.

Il nous a été impossible de connaître la quantité de véronal absorbée ; la malade étant morte le troisième jour sans sortir du coma.

Il n'a pas été pratiqué d'autopsie.

Deuxième cas : Intoxication suivie de mort (fév. 1930).

Malade K... Service du docteur Trémolières.

Sujet russe, grand, d'une robuste constitution, a été amené également dans le coma. Sa famille sait qu'il a absorbé dans une crise de neurasthénie aiguë un hypnotique que l'on pense être du Véronal (6 gr. ?)

Un sondage effectué à la cinquantième heure environ après l'absorption du toxique donne 110 c.c. d'urine trouble mais peu colorée renfermant 0 gr. 052 d'un produit cristallisé fondant à 185°-187° ; soit 0,472 par litre.

Son dérivé dixanthylé fondant à + 245 — 246° au Bloc Maquenne, on en conclut bien à une intoxication par le Véronal.

Un deuxième sondage effectué 16 heures après donne 150 c.c. d'urine renfermant 0.065 de véronal fondant à 185-187°. Ce qui correspond à une teneur de 0,433 par litre.

Malgré les saignées abondantes, les injections de caféine et d'huile camphrée, le malade meurt le quatrième jour.

La famille ayant mis opposition, nous ne pûmes à notre grand regret faire de recherches dans les viscères.

Les résultats des dosages dans le sang sont donnés plus loin.

ETUDE DE L'ELIMINATION DU VERONAL, GARDENAL, SOMNIFENE

Premier cas. — Elimination journalière chez une internée de Sainte-Anne, absorbant depuis 10 jours 0 gr. 75 par jour de Véronal.

L'élimination totale du véronal par l'organisme après l'absorption d'une seule dose ayant été très étudiée, il nous a paru intéressant d'observer l'élimination journalière chez une malade absorbant quotidiennement une dose élevée de diethylmalonylurée.

Mme F..., troisième quartier femmes, à l'Asile Sainte-Anne absorbe depuis 10 jours 0 gr. 75 par jour de Véronal sans aucun signe d'intoxication.

Le 27 août on recueille 1.000 c.c. d'urine représentant l'urine de 24 heures. Cette urine est de couleur normale sans albumine.

En suivant la technique précédente, on extrait d'une portion de filtrat correspondant à 200 c.c. d'urine une quantité importante de cristaux légèrement rougeâtres. Après deux purifications par le noir animal, une reprise par l'éther et par l'eau on obtient 0 gr. 132 de fins cristaux fondant à 190°-191°. Le dérivé dixanthylé fond à + 245° + 246°; ce sont là tous les caractères du véronal pur.

Nous avons donc chez cette malade une élimination par 24 heures de :

$$0 \text{ gr. } 132 \times 5 = 0 \text{ gr. } 660.$$

Le pourcentage d'élimination journalière est donc de :

$$\frac{0,666 \times 100}{0,75} = 88 \%$$

Nous avons renouvelé cette expérience les jours suivants et nous l'avons fait porter cette fois sur quatre jours consécutifs, la malade continuant toujours à absorber la même dose d'hypnotique soit 0 gr. 75 par jour.

Les résultats sont les suivants :

Jours	Quantité éliminée en 24 heures	Pourcentage d'élimination journalière
27 Août	0.660	88 %
28 —	0.607	81 %
29 —	0.652	87 %
30 —	0.603	80.5 %
31 —	0.635	84.7 %

On est frappé de la régularité de l'élimination qui est en moyenne de 84,2 % de la dose journalière.

On constate que chez une malade soumise à un régime régulier l'élimination du Véronal se fait bien, à condition toutefois que le foie et le rein soient en bon état (Trémolières et Tardieu).

2° *Elimination urinaire de la Phenylethylmanolynurée* (Gardénal). — Nous avons recherché également quel est le taux de l'élimination du Gardénal chez un sujet qui en absorbe régulièrement chaque jour.

Le nombre, en effet, des habitués au Gardénal s'accroît de jour en jour. Sans compter les épileptiques et les blessés du crâne qui en absorbent quotidiennement sur conseil médical, les déprimés, les anxieux et les névrosés de toute nature cherchent dans cet hypnotique un remède à leur lassitude.

Nous avons eu l'occasion d'observer avec notre ami le docteur Tardieu à la consultation de gastro-entérologie de l'hôpital Boucicaut plusieurs malades adonnés depuis plusieurs mois ou plusieurs années au gardénal, qui arrivaient se plaignant de troubles digestifs ou hépatiques.

L'un d'eux, Mlle B..., vint à la visite le 25 juin 1929 pour

troubles gastro-intestinaux. Elle prenait tous les soirs depuis deux ans un comprimé de 0,10 de Gardénal avant de se coucher.

Nous avons recherché le gardénal dans l'urine de cette malade. Elle urinait 1 litre 800 par 24 heures.

L'extraction a porté sur une partie aliquote d'urine déféquée correspondant à 250 c.c. d'urine.

De 250 c.c. on isola 0 gr. 011 d'un produit cristallisé dont le point de fusion instantané au Bloc Maquenne était $+ 172^{\circ}$ - 173° correspondant au Gardénal.

La concentration par litre d'urines était de 0 gr. 044 0/00.

L'élimination totale par 24 heures était $1,8 \times 0,044 = 0,0982$.

Le pourcentage d'élimination est donc de 79,2 %.

Etonnés d'en trouver une aussi forte proportion puisqu'on est d'accord pour reconnaître que le gardénal n'est éliminé qu'à raison de 20 % en nature, les 80 % de reste étant détruits dans l'organisme (M. Reinert, 37), nous avons entrepris une étude aussi rigoureuse que possible de l'élimination chez l'homme après absorption « per os » de doses journalières répétées. Les résultats qui suivent nous prouvent que nous assistons chez cette malade à une véritable « décharge urinaire » de gardénal dans son organisme où il s'était accumulé par déficience hépatique ou rénale momentanée qui avait provoqué un début d'intoxication et l'alerte du sujet. En effet l'élimination du gardénal n'atteint jamais 80 % mais s'étage entre 20 et 30 % comme on va le voir.

Expérience. — Le sujet est une malade anxieuse de l'Asile Sainte-Anne soignée par notre ami le docteur Le Guillant qui a bien voulu se mettre à notre disposition pour cette épreuve.

Son urine était recueillie avec le plus grand soin par la surveillante, la malade étant d'ailleurs pénétrée de l'importance de cette expérience, au point de vue de sa santé future.

La malade a absorbé chaque jour 2 comprimés de 0,10 de Gardénal, soit 0,20 pendant 7 jours.

Notre expérience a porté sur 8 jours.

L'urine des 24 heures était mesurée exactement et l'extraction portait sur la totalité afin de diminuer autant que possible les erreurs et les pertes.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Doses	Jours	Dates	Volume d'urine	Elimination en milligr.	Pourcentage d'élimination
0.20	1	22 Oct. 29			
0.20	2	23 —	810 cc.	43	21.5 %
0.20	3	24 —	540 cc.	72	36 %
0.20	4	25 —	940 cc.	69	34.5 %
0.20	5	26 —	560 cc.	53	26.5 %
0.20	6	27 —	480 cc.	61	25.5 %
0.20	7	28 —	510 cc.	56	28 %
0.20	8	29 —	850 cc.	61	30.5 %

En 7 jours la malade a absorbé $7 \times 0,20 = 1$ gr. 40
de gardénal et en a éliminé 0 gr. 405
soit un pourcentage de 28,9 %

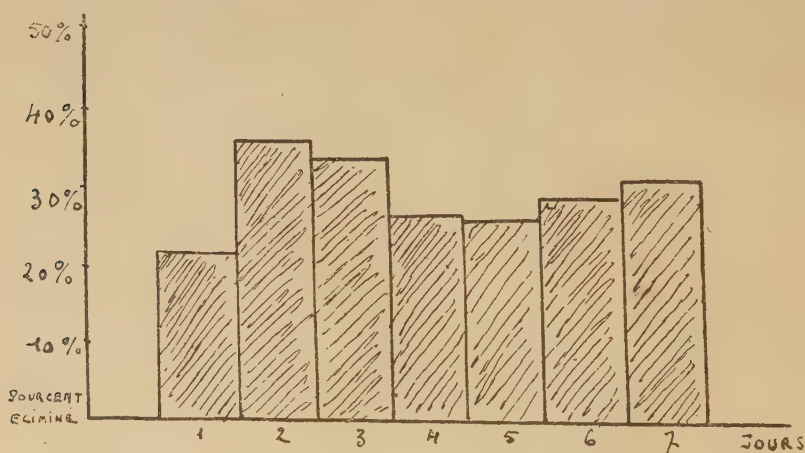


Schéma de l'élimination du Gardénal

3° *Elimination urinaire du Somnifère.* — Le somnifère Roche est, d'après le fabricant, une solution alcoolo-glycérino-aqueuse de sels diéthylaminés des acides diéthyl- et isopropylallylbarbituriques. Cette solution est titrée de telle sorte que 1 centimètre cube ou

XXX gouttes renfermant 0,10 de diethylmalonylurée + 0,10 d'isopropylallylmalonylurée.

C'est un sédatif puissant largement employé dans les Asiles pour tous les états d'agitation et d'excitation.

Nous avons étudié son élimination comme celle du Véronal et du Gardénal chez des aliénés qui en absorbaient par voie buccale une forte dose chaque jour.

Expérience : La malade A..., de l'Asile Sainte-Anne, sevrée d'hypnotiques depuis un certain temps, reçoit à partir du 2 décembre 1929, L gouttes par jour de somnifène, soit 0,165 de diethylmalonylurée + 0,165 d'isopropylallylmalonylurée ou 0 gr. 330 de dérivés barbituriques, ce qui peut être considéré comme une dose journalière un peu supérieure à la normale. A partir du moment où elle a pris ses premières gouttes on recueille l'urine de 24 heures.

On pratique l'extraction sur la totalité de l'urine. L'expérience a porté sur 8 jours et a donné les résultats suivants.

Doses	Jours	Doses	Volume d'urine	Elimination en milligr.	Pourcentage d'élimination
4 gouttes soit } 0.165 Vér. 0.165 Iso.	1	2 Déc. 29	630 cc.	0.031	9.3 %
id.	2	3 —	750 cc.	0.038	11.4 %
id.	3	4 —	640 cc.	0.083	24.9 %
id.	4	5 —	1630 cc.	0.086	25.8 %
id.	5	6 —	515 cc.	0.035	10.5 %
id.	6	7 —	1400 cc.	0.085	25.5 %
id.	7	8 —	850 cc.	0.601	18.3 %
id.	8	9 —	460 cc.	0.076	22.8 %

En 8 jours la malade a absorbé $8 \times 0,330 =$ 2 gr. 64
de somnifène et n'en a éliminé que..... 0 gr. 495

Le pourcentage moyen d'élimination en nature est donc de
18,7 %.

De tels résultats n'étaient pas à prévoir puisque nous avons

trouvé précédemment pour le véronal administré journellement en nature par la bouche une élimination voisine de 80 %.

Il résulte donc que lorsque le véronal est associé à l'isopropylalylmalonylurée en solution dans la diéthylamine son élimination varie et le pourcentage éliminé en nature baisse.

On peut représenter l'élimination du somnifène par le schéma suivant :

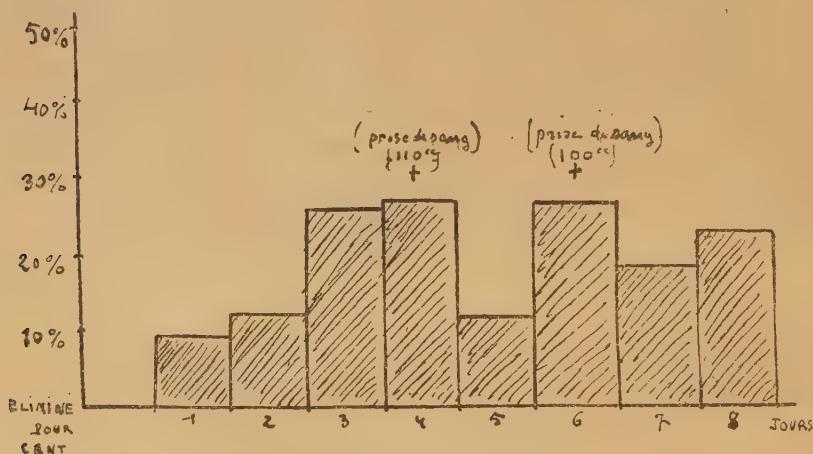


Schéma de l'élimination du somnifène

On a pratiqué deux prises de sang au 4^e et 6^e jour, afin de doser le somnifène dans le sang au cours de cette expérience. Les deux prises étaient faibles : 110 et 100 c.c. A chaque prise correspond le lendemain une diminution dans l'élimination du somnifène dont le pourcentage tombe la première fois de 25 % à 10 % et la deuxième fois de 25 % à 18 %.

En résumé. — De ces expériences d'élimination urinaire il ressort que chez des malades absorbant quotidiennement des doses répétées d'hypnotiques, l'élimination urinaire est sensiblement régulière pour chaque dérivé envisagé, soit :

Pour le Véronal 80 % environ de la dose ingérée chaque jour.

Pour le Gardénal de 20 à 30 %.

Pour le somnifène, mélange à parties égales de Véronal et de Numal de 18 à 20 %.

CHAPITRE V

Fixation des dérivés barbituriques sur le sang de l'homme et sur le sang du lapin

Généralités. — Que l'on injecte l'hypnotique dans la veine ou qu'on l'absorbe par la bouche, le sang est toujours le véhicule qui le transportera dans les centres nerveux.

Chaque fois qu'il nous a été possible de le faire, nous avons pratiqué des dosages dans le sang, soit de lapins auxquels nous avons injecté une dose connue d'hypnagogue, soit d'intoxiqués, soit de malades en traitement.

Les résultats sont les plus discordants. Certains auteurs prétendent Keeser. 26) que si on en trouve toujours dans les 2 ou 3 heures qui suivent l'injection intraveineuse, cette limite dépassée l'hypnotique n'est généralement plus décelable même à l'état de traces. Il ne réapparaîtrait qu'au moment de la mort, lorsque la circulation s'arrête. Le produit toxique semble diffuser à ce moment et se répandre par tout le corps, ce qui fait que sa localisation est beaucoup moins élective que lors de l'hypnose simple.

Si le toxique est absorbé par la voie digestive, on peut le déceler dans le sang, pendant une période beaucoup plus longue, l'absorption se faisant plus lentement, et la prise étant également plus forte.

Chez un sujet russe mort le quatrième jour à l'hôpital, après l'absorption d'une forte dose de véronal, nous avons trouvé cet hypnotique dans le sang prélevé la cinquantième heure après l'intoxication, alors que nous n'avons pu en déceler dans une autre prise de

sang faite environ à la soixante-sixième heure. Le malade mourut à la quatre-vingt-douzième heure après l'absorption de véronal.

Fabre et Fredet (14) ont montré la fixation importante des dérivés barbituriques sur le sang, et particulièrement sur les globules rouges, qui semblent les véhiculer plus spécialement. Nous avons pu vérifier ces résultats au cours de nos expériences.

Envisageons les différents essais et tâtonnements qui nous ont amené au choix d'une méthode d'extraction. Ils ont porté d'abord sur le sang d'intoxiqués par voie buccale (cachets, comprimés, gouttes).

A. — CHEZ L'HOMME

Premier cas. — Mme X..., 48 ans absorbe entre 14 h. 30 et 15 heures, le 8 juin, une quantité formidable d'hypnotiques divers dont :

4 tubes de comprimés de Gardénal à 0,05, soit 4 gr. de Gardénal ;

1 tube de 10 comprimés de Luminal à 0,10, soit 1 gr. de Luminal ;

3 tubes de 10 dragées de Sandoptal à 0,20, soit 6 gr. de Sandoptal ;

2 boîtes de 20 comprimés de Véronal à 0,25, soit 10 gr. de Véronal.

En tout : 21 gr. d'hypnotiques barbituriques.

Aucun vomissement n'a évacué ce véritable « repas » hypnotique.

Une prise de sang ayant été faite à la septième heure environ, les 200 c.c. que nous avons à notre disposition étaient bien indiqués pour faire des dosages comparatifs. Ce sang était très épais, de couleur foncée, se coagulant difficilement. Il fut partagé en deux parties de chacune 100 c.c.

a) La première portion de 100 c.c. du mélange homogénéisé de sérum et de globules a été traitée de la façon suivante :

On ajoute peu à peu en agitant fortement aux 100 c.c. de sang placés dans un ballon, 400 c.c. d'alcool tartrique à 2 %. On laisse

au B. M. pendant 3 heures avec un réfrigérant à reflux. Après refroidissement la liqueur alcoolique est filtrée ; on lave soigneusement par deux fois le résidu, avec de l'alcool à 60° et on concentre par distillation. Le résidu est repris par deux fois son volume d'alcool absolu chaud, qui précipite les matières albuminoïdes. On agite vigoureusement avec un agitateur pour dissoudre tout ce qui pourrait rester dans le coagulum albumineux, on filtre après 2 heures de contact et on lave le résidu avec un peu d'alcool absolu. On chasse l'alcool au B. M. et on reprend le résidu par l'eau chaude légèrement alcaline. La solution refroidie est placée dans une ampoule et agitée plusieurs fois avec de l'éther, afin d'éliminer les matières grasses.

La liqueur acidifiée franchement avec de l'acide sulfurique dilué, est épuisée soigneusement plusieurs fois avec de l'éther qui enlève l'hypnotique. On lave l'éther avec très peu d'eau et on dessèche sur du sulfate de soude anhydre. On évapore la solution éthérée, et on obtient un produit cristallisé noirâtre. On purifie ce résidu, une, deux ou trois fois, selon le cas, en le reprenant par l'eau chaude en présence de charbon de sang. Lorsqu'on a obtenu une solution aqueuse incolore, on évapore au B. M. jusqu'à ce qu'au bord du liquide apparaissent de petits cristaux, on couvre et laisse cristalliser.

On extrait de cette façon de 100 c.c. de sang homogénéisé (sérum + globules) :

0 gr. 106 d'un produit mal cristallisé qui est un mélange des divers hypnotiques ingérés.

La concentration d'hypnotique dans le sang était donc de :

1 gr. 06 o/oo.

Nous avons essayé de purifier le produit par cristallisation successives dans l'eau, mais nous n'avons pu obtenir qu'un mélange de cristaux fondant entre 130° et 180°. Alors que les points de fusion de chacun des hypnotiques ingérés sont les suivants :

Gardénal ou Luminal 172°-173° ; Sandoptal 137°-138° ; Véronal 190°-191°.

b) Sur la deuxième portion de 100 c.c. de sang on a pratiqué un autre procédé d'extraction.

On triture le caillot avec de l'acide tartrique pulvérisé (1/20

environ). On ajoute alors au mortier du sable lavé, et on fait une pâte épaisse que l'on met dans un cristalliseur. On dessèche complètement dans le vide sulfurique.

On pulvérise alors au mortier jusqu'à obtention de poudre grossière et on épuise au soxhlet par l'alcool. Le liquide d'épuisement est évaporé au B. M. et repris par l'éther. Les matières albuminoïdes qui ont pu passer, sont coagulées ; on filtre.

On agite la solution étherée dans une ampoule avec une solution de soude à 1 %. Les acides barbituriques passent en solution alcaline. On sépare la solution et on l'acidifie franchement par l'acide sulfurique dilué. On l'épuise alors plusieurs fois par l'éther que l'on sépare, lave, dessèche sur du sulfate de soude anhydre et évapore. Le résidu est rougeâtre. On le dessèche dans le vide. On le reprend par l'alcool absolu, filtre et évapore la solution alcoolique.

Le résidu est repris par l'eau au B. M. en présence de charbon de sang. On filtre, on évapore, on obtient alors :

0 gr. 081 d'un mélange de divers cristaux plus ou moins bien formés.

Le rendement par cette méthode est bien inférieur à celui du procédé ordinaire qui donnait pour la même quantité de sang 0 gr. 106 au lieu de 0 gr. 081.

Ce procédé beaucoup plus long et plus minutieux ne semble donc pas à retenir.

En résumé :

a) La première méthode d'extraction (Stas-Otto-Ogier) donne une teneur de : 1 gr. 06 d'acides barbituriques par litre de sang.

b) La deuxième méthode (lixiviation à l'alcool de l'extrait desséché) donne une teneur de 0 gr. 81 d'acides barbituriques par litre de sang.

La différence (perte) est importante puisqu'elle correspond au quart de la valeur totale.

c) En se plaçant au point de vue clinique, on remarquera la dose élevée de dérivés de la malonylurée, contenue dans le sang de ce sujet à la septième heure de l'intoxication qui correspond à environ 5 gr. pour le sang total (si l'on évalue le volume du sang total à 5 litres).

On comprend l'intérêt des saignées abondantes préconisées par Tardieu où l'on remplace le sang par du sérum, le « lavage » du sang étant très efficace, lorsque le lavage d'estomac est impossible à pratiquer, ou inefficace parce que trop tardif.

Deuxième cas. — Malade N..., Service du docteur Trémolières. Hôpital Boucicaut.

Cette malade fut le sujet de deux dosages précédemment cités de Véronal dans les urines, à 24 heures d'intervalle, qui donnaient une teneur de 1 gr. 21 $\frac{0}{100}$ (urine de la 20^e heure) et de 0 gr. 91 pour mille (urine de la 40^e heure).

Il nous a été impossible de connaître la quantité de véronal absorbée.

Dès qu'on reconnut l'intoxication par les barbituriques on fit immédiatement une saignée abondante. Nous pratiquâmes alors sur ce sang les différents essais suivants :

a) *Premier dosage* : On prend 180 c.c. de sang total provenant de la saignée pratiquée à la 20^e heure. On dilue soigneusement dans 900 gr. d'eau distillée. Le mélange est porté à l'ébullition quelques instants pour détruire l'antitrypsine. On laisse refroidir à 50°-55° et on ajoute 4 gr. de pancréatine, en agitant. On laisse 12 heures à l'étuve à 50°-55° ; quand la protéolyse est achevée ou qu'il ne reste plus dans la masse de caillots non dissous, on filtre. Le liquide limpide obtenu est partagé en deux portions de 500 c.c. chacune.

A) Une portion est saturée de sulfate d'ammoniaque, il se forme un précipité. On laisse déposer deux heures environ et on filtre. On acidifie alors par l'acide chlorhydrique dilué et épuise trois fois à l'éther.

On lave l'éther avec très peu d'eau, on dessèche sur du sulfate de soude anhydre. On évapore l'éther et on fait cristalliser le résidu dans l'eau.

On obtient ainsi 0 gr. 031 de Véronal, ce qui correspond à une teneur de 0 gr. 34 par litre de sang.

B) La deuxième portion de 500 c.c. correspondant à 90 c.c. de sang est acidulée directement par l'acide chlorhydrique dilué. Il se forme un coagulum volumineux de substances albuminoïdes. On

filtre et lave soigneusement à l'eau. Le filtrat jaune citron épuisé par l'éther, ne donne après purification que 0,0055 de Véronal, soit une teneur de 0 gr. 061 par litre de sang.

On constate que la coagulation massive des albuminoïdes du sang a retenu la presque totalité du Véronal. Si l'on agite directement avec l'éther, sans filtrer, les émulsions tenaces qui se forment rendent cette méthode impraticable.

b) *Deuxième dosage.* — Une autre portion de 165 gr. de sang prélevé à la même malade, à la même saignée, fut traitée par le procédé classique de Stas-Otto-Ogier à l'alcool tartrique.

On isola 0 gr. 019 de véronal bien cristallisé, ce qui correspond à une teneur de 0 gr. 115 par litre de sang.

On s'aperçoit que le procédé qui donne le meilleur rendement est la *protéolyse pancréatique avec élimination des albumoses par saturation avec le sulfate d'ammoniaque.*

On obtient ainsi un liquide homogène se prêtant facilement aux manipulations, à condition de respecter les conditions suivantes :

1° Les caillots dilacérés doivent être triturés au mortier avec du sable lavé avant l'ébullition pour faciliter l'action de la trypsine qui pénètre difficilement ceux-ci, surtout lorsqu'ils ont subi l'action de la chaleur.

2° Il faut acidifier faiblement et avec précaution afin d'éviter la précipitation des produits de désintégration des albuminoïdes du sang.

3° Il faut opérer en milieu suffisamment dilué pour que l'addition d'éther ne produise pas de précipités dans la solution à épuiser.

Troisième cas. — Dosage des dérivés barbituriques dans le sang d'une agitée recevant chaque jour un mélange de :

0 gr. 165 de diéthylmalonylurée,

et 0 gr. 165 d'isopropylallylmalonylurée.

Cette malade de l'Asile Sainte-Anne mise au régime, pour nos expériences d'élimination urinaire, de L gouttes par jour de somnifène fut saignée au quatrième jour et au sixième jour de son traitement.

Les deux saignées furent pratiquées entre 10 et 11 heures du matin, le 4^e et le 6^e jour, alors que la malade prenait son hypnotique dans la soirée.

a) *Sang du quatrième jour :*

110 c.c. de sang total traité par la méthode de protéolyse pancréatique abandonnent à l'éther : 0 gr. 005 du mélange des deux acides.

La teneur d'hypnagogue par litre de sang était donc de 0 gr. 0459 pour 1.000.

Soit environ 0,229 pour le sang total.

(Si l'on admet que le volume de sang total soit de 5 litres.)

La malade avait absorbé déjà :

0,860 de diethylmalonylurée,

et 0,860 d'isopropylallylmalonylurée.

b) *Sang du sixième jour :*

100 c.c. de sang total traités de la même façon abandonnent à l'éther 0 gr. 0027 du mélange des deux acides.

La teneur par litre de sang était alors de 0 gr. 027 %.

Soit environ 0 gr. 135 pour le sang total.

La malade avait absorbé à cette heure :

0 gr. 990 de diethylmalonylurée,

et 0 gr. 990 d'isopropylallylmalonylurée.

Quatrième cas. — Intoxication par le véronal suivie de mort.

Dosage séparé du Véronal fixé sur les globules et le sérum.

Le sujet de nationalité russe est un psychasténique de longue date, qui résolut de mettre fin à ses jours par absorption massive de Véronal :

D'après sa famille il en aurait absorbé au moins 6 gr. sans que nous puissions l'affirmer formellement. Amené à l'hôpital dans le coma, on a pratiqué immédiatement un sondage vésical et une prise de sang d'un poids de 112 gr.

On centrifugea afin de séparer les globules du sérum.

68 de globules renfermaient 0 gr. 0025 de Véronal.

44 de sérum renfermaient 0 gr. 0015 de Véronal.

112 de sang renfermaient 0 gr. 0040 de Véronal.

La teneur par litre de sang était donc de 0 gr. 040. Soit environ 0 gr. 200 pour le sang total.

On remarque que l'hypnotique se fixe en plus forte quantité

sur les hématies (Fabre, 14). Le rapport de répartition entre les hématies et le sérum est ici de 1,66.

Sur une deuxième prise de sang faite à la 66^e heure nous ne pûmes plus déceler aucune trace de barbiturique. Le malade mourut vers la 92^e heure après absorption du toxique et, la famille ayant mis opposition à l'autopsie, il nous fut impossible à notre grand regret d'examiner ses viscères et son cerveau.

B. — CHEZ LE LAPIN

Dosage de gardénal dans le sang après injection intraveineuse

Première expérience. — Elle a porté sur un lapin de 2 kg. 700, auquel on a injecté 0,30 de Gardénal soluble (1) à raison de :

1 injection de 0 gr. 10 à 8 h. 50,

1 injection de 0 gr. 20 à 10 h. 30.

Le lapin dort dans la position où on le place, ses muscles sont à l'état de résolution totale.

On lui sectionne la carotide à 14 h. 30 et on recueille 85 gr. de sang total que l'on dilue immédiatement dans l'eau distillée et sur lequel on pratique une protéolyse pancréatique et une extraction à l'éther, selon la technique indiquée par M. Fabre.

Le résidu cristallin, purifié plusieurs fois par l'eau en présence de charbon de sang, pèse 0 gr. 185.

Il fond à 170°-171°, c'est bien du Gardénal pur.

Donc 4 heures après la dernière injection on retrouve dans le sang 61 % environ du Gardénal injecté.

Du rein on isole : 0 gr. 006 de Gardénal.

Du foie on isole : 0 gr. 0075 de Gardénal.

Deuxième expérience. — Un lapin de 2 kg. 650 reçoit :

A 9 h. 50 : 0 gr. 15 de Gardénal soluble dans la veine de l'oreille.

(1) Nous avons employé le Gardénal sodique que la maison Poulenc livre en poudre dans des ampoules scellées.

A 10 h. 20 : 0 gr. 15 de Gardénal soluble dans la veine de l'oreille.

Soit : 0 gr. 30.

On sacrifie le lapin, qui dort tranquillement, à 11 h. 50 par section de la carotide et on recueille le sang.

On le laisse cette fois coaguler spontanément et il est abandonné pendant 8 jours dans un verre à pied à la température du laboratoire.

Au bout de ces 8 jours on sépare d'une part 35 gr. de sérum laqué rougeâtre, et 37 gr. de caillot que l'on égoutte soigneusement pour retirer tout le sérum qu'il peut contenir.

Deux dosages portant sur chaque portion donnent :

Sérum : 0 gr. 004 de gard. crist.

Caillot : 0 gr. 0015 de gard. crist.

Le foie et le rein abandonnés dans les mêmes conditions donnent :

Foie total : 0,0025 de gardénal crist.

2 reins : néant.

Troisième expérience. — Un lapin de 3 kg. 280 reçoit :

A 9 h. 30 : 0,15 de gardénal sol. dans la veine de l'oreille,

A 10 h. : 0,15 de gardénal sol. dans la veine de l'oreille,

A 10 h. 30 : 0,10 de gardénal sol. dans la veine de l'oreille,

A 15 h. 30 : 0,10 de gardénal sol. dans la veine de l'oreille.

Soit au total 0,500 de Gardénal injecté en 6 heures.

On sacrifie le lapin à 16 h. 30 par section de la carotide et on abandonne le sang dans un verre à expériences.

Au bout de 15 jours on sépare 35 gr. de sérum et 40 gr. de globules.

L'analyse donne les résultats suivants :

35 gr. de sérum contiennent 0,0525 de Gardénal,

40 gr. de globules contiennent 0,0025 de Gardénal.

On remarque qu'une grande partie du Gardénal est détruit dans ces conditions, et que si l'on veut connaître la teneur véritable en acides barbituriques du milieu sanguin, il importe de pratiquer le dosage dès la sortie de la veine, pour éviter l'action des ferments du sang et des altérations dues au début de putréfaction.

On remarque aussi que, contrairement à ce qui se passe pour le sang frais, dans les deux derniers cas où le sang est altéré, c'est le sérum qui contient alors la plus forte proportion d'hypnotique.

Les sels qui chargent les hématies obéissant aux lois de l'osmose, diffusent d'abord dans le sérum ; il doit y avoir à un moment donné un état d'équilibre, puis la fermentation se poursuivant le sérum s'alcalinise de plus en plus et retient la plus grosse quantité des barbituriques.

Résumé. — Des nombreuses analyses que nous avons pratiquées sur le sang d'intoxiqués, de malades ou de lapins inoculés, il ressort que :

1° La meilleure méthode d'extraction du milieu sanguin est la protéolyse pancréatique préconisée par M. Fabre.

2° La concentration dans le sang varie selon la quantité d'hypnotique ingérée. Après l'absorption d'une dose mortelle, on peut encore en déceler dans le sang d'un sujet à la 50^e heure de l'intoxication.

Sa présence dans le sang après absorption « per os » est beaucoup plus durable qu'après injection intraveineuse.

3° Le Gardénal est détruit en grande partie dans le sang abandonné à la putréfaction. La répartition entre les éléments solides et liquides du sang change de sens au cours de cette putréfaction.

La teneur du sérum est alors plus forte que celle des globules à l'inverse de ce qui a lieu pour le sang frais.

On a intérêt à pratiquer les extractions du sang le plus rapidement possible.

CHAPITRE VI

Fixation des dérivés barbituriques sur les centres nerveux

Problème de l'action hypnotique. Essais de localisation cérébrale.

Plus encore que la fixation sur les viscères, est intéressante la fixation sur les centres nerveux, puisque c'est de cette fixation que dépend l'état de sommeil.

Les toxicologues admettent généralement que les dérivés alcoylés de la malonylurée se fixent surtout sur le cerveau et la moelle.

En 1925 MM. Fabre et Fredet, au cours de leurs expériences sur la localisation chez le chien, après une injection intraveineuse de 1 gr. de diethyl- et 1 gr. d'isopropylallyl- trouvaient 0,138 % dans le premier cas et 0 gr. 068 % dans le deuxième cas de ces hypnotiques fixés sur le cerveau et la moelle, alors qu'il n'y avait que 5 à 6 mgr. % de fixés sur le foie et le rein, c'est-à-dire deux ou trois fois plus sur les centres nerveux que partout ailleurs.

Mais une autre question a été posée par les pharmacologistes et les physiologistes. Les dérivés barbituriques imprègnent-ils également la totalité des centres nerveux ou se localisent-ils plus spécialement dans des portions bien déterminées de l'encéphale ? Cette question est du plus haut intérêt puisqu'elle porte sur le mécanisme du sommeil artificiel, qui a fait le sujet de si nombreux travaux, particulièrement au cours de ces dernières années.

Les recherches de van Economo et de l'école viennoise tendant à démontrer l'existence des centres du sommeil dans la région sub-

thalamique ont trouvé de nombreux partisans. En Allemagne Keeser (25-26), Ehrismann et Joachimoglu (9) étudièrent particulièrement la question des localisation cérébrales des dérivés barbituriques chez le lapin.

Keeser (25-26) pratiqua deux séries d'expériences, les unes histologiques, les autres chimiques.

Dans les premières il injecte dans la veine de l'oreille du lapin des complexes ferriques de Gardénal et de Dial à haute teneur en fer, et doués de pouvoir hypnotique. L'animal est saigné durant son sommeil et des coupes pratiquées dans son cerveau révèlent la présence de fer dans la *région thalamique* et dans les *corps striés*.

Nous avons essayé de répéter les expériences de Keeser. Nous ne sommes pas arrivés à ses conclusions.

D'une part il nous a été impossible de préparer un complexe ferrique, présentant les caractéristiques du corps obtenu par Keeser, d'autre part, les corps que nous avons préparés étaient très peu solubles dans l'eau, et une suspension injectée dans la veine n'a produit qu'un effet hypnotique très léger et aucune fixation nette de fer décelable histologiquement, si ce n'est quelques granulations rares et diffuses se colorant en bleu par le Ferrocyanure (1). Les expériences chimiques de Keeser consistaient en des microsublimations pratiquées à l'aide de l'appareil de Kempf (26 bis) sur les extraits des différentes parties de l'encéphale du lapin, endormi par voie intra-veineuse, à l'aide du Dial ou du Gardénal soluble.

Par cette méthode, il isole des cristaux typiques, en grosse quantité du thalamus et du corps strié. Il n'en rencontra jamais dans les hémisphères cérébraux, ni dans le cerveau moyen, cervelet et bulbe. Ce résultat concordait en tous points avec celui qu'il obtenait histologiquement après injection de dérivés ferriques. Il fallait donc admettre que le « complexe ? » préparé par cet auteur, véhiculé sans dissociation par le sang, se fixait en nature dans un territoire bien déterminé de l'encéphale.

N'ayant pu répéter les premières expériences histologiques nous avons entrepris sur le lapin des recherches analogues par la méthode

(1) Nous tenons à remercier bien vivement M. Normand, conservateur du Musée Letulle, à l'Hôpital Boucicaut, qui a mis à notre service sa bonne volonté et sa haute compétence en matière histologique.

de microsublimation en employant comme hypnotique l'acide phényl-éthylbarbiturique soluble.

Avant d'envisager chaque expérience en particulier, nous allons exposer la méthode d'extraction que nous avons employée, ainsi que notre technique de microsublimation.

EXTRACTION DES DERIVES BARBITURIQUES DE LA MATIERE CEREBRALE

A) Description de la méthode. — Chaque portion du cerveau à examiner est finement hachée sur une plaque de verre, la pulpe obtenue est délayée dans un vase à précipitation avec 30 c.c. d'alcool à 60° additionné de 10 % environ d'acide tartrique. On couvre et laisse 48 heures à l'étuve à 37° en agitant le plus fréquemment possible.

On décante, filtre et reprend le résidu par le même volume d'alcool à 90° ; on triture soigneusement avec un agitateur et on remet deux jours à l'étuve à 37° en agitant de temps en temps.

On décante, filtre et recommence la même opération avec le même volume d'alcool absolu.

Les liqueurs alcooliques réunies sont filtrées pour éliminer des précipités formés par le mélange d'alcools de titres différents.

On ajoute le quart en volume d'eau distillée et on expose sur le couvercle d'un B. M. bouillant jusqu'à ce que l'alcool soit chassé.

Le résidu aqueux acide, est épuisé dans une petite ampoule à décantation, par la moitié de son volume d'éther de pétrole.

On décante la couche aqueuse dans un verre, on l'alcalinise exactement avec de la lessive de soude diluée au 1/10, et on l'épuise par l'éther.

Cette double purification en milieu acide et alcalin, a pour but d'éliminer la plus grande partie des lipoides et de la cholestérine, si abondants dans la matière cérébrale. L'addition initiale d'éther de pétrole facilite d'ailleurs la séparation des solvants, et évite les émulsions tenaces si désagréables, lorsqu'on n'a pas à sa disposition des centrifugeuses de gros calibre.

La solution aqueuse ainsi purifiée est acidulée légèrement au

papier de tournesol par l'acide sulfurique dilué au 1/10 afin de déplacer le dérivé barbiturique.

On le fait alors passer en solution dans l'éther au cours de trois épuisements successifs.

On a soin d'agiter vigoureusement plusieurs fois pour chaque épuisement qui doit être d'autant plus minutieux que l'on travaille sur des fractions de milligramme de produit.

Les liqueurs éthérées réunies, sont desséchées sur du sulfate de soude anhydre, filtrées et évaporées avec précaution à l'étuve à 37° jusqu'à réduction à 2 c.c. environ.

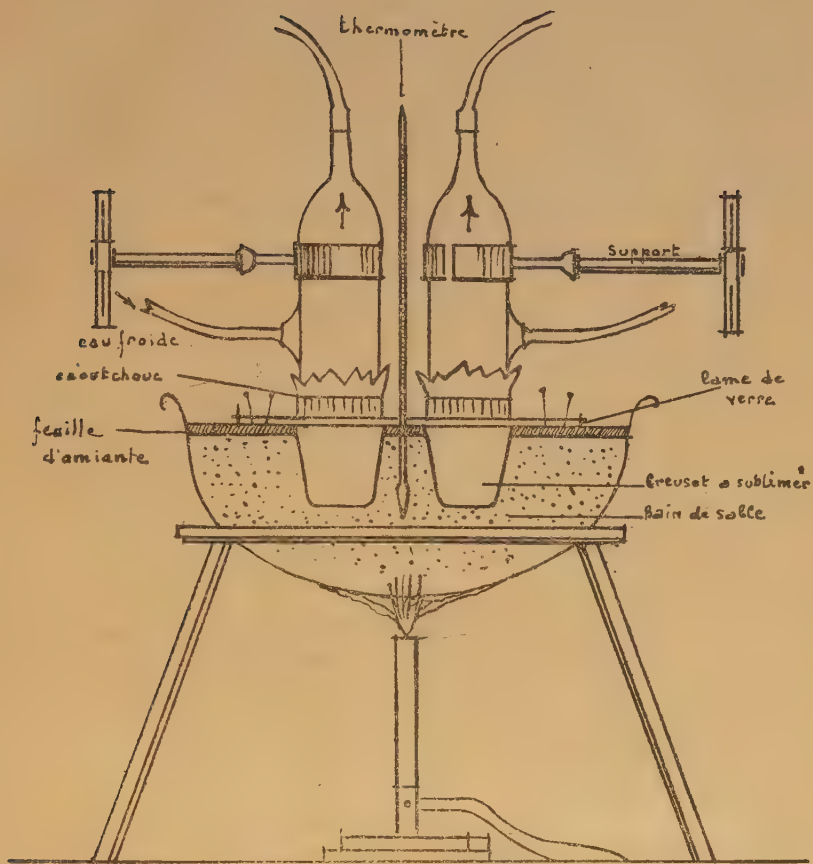
B) Microsublimation. — Nous avons imaginé pour nos expériences de microsublimation, un petit appareil très simple qui nous a donné de bons résultats.

L'appareil de chauffe consiste en un petit bain de sable ordinaire, chauffé au Bec Mecker à grille réglable. On recouvre la surface du sable d'une feuille d'amiante de 2 à 3 mm. d'épaisseur. On y a ménagé deux trous de 30 mm. de diamètre pour deux petits creusets en porcelaine de 25 mm. de hauteur.

Ces deux ouvertures sont suffisamment rapprochées pour être recouvertes par une lame de verre porte-objet ordinaire. L'appareil réfrigérant est un embout de verre à tube latéral dont le gros diamètre est fermé par une feuille de caoutchouc solidement tendue. Le caoutchouc refroidi par la circulation d'eau recouvre la surface du creuset sur la lame de verre. Chaque creuset est muni de son petit réfrigérant.

Dans un creuset on place l'extrait à sublimer, et dans l'autre 0,001 de phényléthylmalonylurée en solution éthérée. Un thermomètre à mercure plongeant entre les deux petits creusets donne la température de chauffe.

On maintient la plaque de verre en place par des épingles fichées dans l'amiante de tous les côtés sauf un. On sublime entre 140° et 150° pendant 6 à 12 heures. Les petits cristaux adhèrent fortement à la lame qu'on a pris la précaution de laver soigneusement à l'alcool-éther avant l'emploi. Sur chaque lame on a le sublimat original et le sublimat type qu'il est facile de comparer.



Appareil à sublimation

La forme des cristaux dépend en effet de la température de chauffe et de la durée de la sublimation (Dufoort, 7 bis).

Nous avons fait de nombreux essais pour déterminer la température optima de sublimation du Gardénal.

Pour être certain d'avoir une sublimation complète il faut chauffer assez haut, c'est-à-dire à 145° environ, mais cette température doit être atteinte très lentement (1 heure environ) afin de ne pas recouvrir l'extrait d'une croûte dure qui peut gêner la sublimation. Il est prudent de reprendre le résidu de la première sublimation par quelques gouttes d'éther et de recommencer une seconde sublimation.

Dans cette technique on doit respecter certains détails qui ont leur importance.

Lorsque l'extrait éthéré est réduit à 2 c.c. environ, on le verse goutte à goutte dans le petit creuset à sublimation, on lave soigneusement 2 ou 3 fois la capsule avec quelques gouttes d'éther et on termine l'évaporation sur le couvercle du B. M. On n'y laisse le creuset que le temps suffisant pour chasser l'éther.

On dessèche alors l'extrait pendant 24 heures dans le vide sulfurique, avec le creuset type contenant 0,001 de gardénal en solution dans l'éther.

Les deux creusets sont alors mis en place, et on chauffe très doucement de façon à mettre environ 1 heure pour atteindre 140°. La flamme du brûleur étant alors réglée à cette température on abandonne l'appareil pendant 10 ou 12 heures. (On a en effet tout à gagner et rien à perdre en pratiquant de longues sublimations.)

Au bout de ce temps on retire la lame de verre que l'on place pendant 22 ou 24 heures dans le vide sulfurique ou mieux sur chlorure de calcium anhydre, car les émanations d'acide peuvent donner parfois des colorations foncées, qui gênent l'examen microscopique.

Les cristaux de phényléthylmalonylurée apparaissent alors en fines « barbes » plus ou moins dissociées dans la préparation au milieu de gouttelettes de lipoides et de gros cristaux de cholestérine que l'on différencie facilement avec un peu d'habitude. Le champ sombre est préférable pour de tels examens.

En comptant le nombre et la densité des cristaux par champ microscopique on peut se faire une idée grossièrement quantitative de la teneur en Gardénal de l'extrait sublimé.

Nous avons essayé de pratiquer sur ces sublimats, des dosages quantitatifs par la méthode néphélométrique comparativement à des gammes étalons faites avec le produit pur. Nous produisions un précipité par le réactif au Sulfate mercurique neutre (Fleury, 17-18).

Cette méthode qui donne de bons résultats lorsqu'on opère avec une solution aqueuse du produit pur, donne avec les sublimats des erreurs trop grossières pour être valable. D'ailleurs on sait que des traces de chlorures suffisant pour dissoudre ces complexes mercuriels et les impuretés entraînées par la sublimation empêchent parfois tout précipité.

Lorsqu'on a des cristaux en quantité suffisante, on peut obtenir une bonne purification par plusieurs sublimations successives, mais ceci n'est guère possible qu'en opérant sur des doses plus fortes, de l'ordre du centigramme par exemple. Les quantités fixées sur les portions de cerveau du lapin ne dépassant jamais quelques milligrammes au cours de nos expériences nous n'avons pu appliquer cette méthode.

ESSAI DE LOCALISATION CEREBRALE

Première expérience. — Lapin de 2 kg. 400. Dose injectée 0,125, soit 0,051 par kilog d'animal.

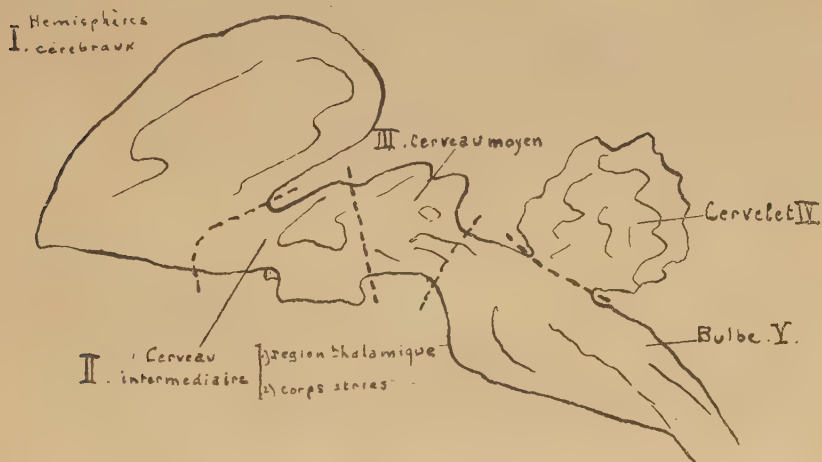


Schéma de sectionnement du cerveau de lapin

A 8 h. 50, 1^{re} injection de 0 gr. 060 de Gardénal soluble.

L'animal ne semble nullement incommodé si ce n'est au bout de 3/4 d'heure : il manifeste un léger trouble et une légère torpeur.

A 9 h. 40, 2^{me} injection de 0 gr. 065 de Gardénal soluble.

Au bout de 20' sa torpeur semble légèrement augmenter, il dort les yeux ouverts mais ses réflexes subsistent.

A 10 h. 20' on le sacrifie par section de la carotide.

On fait sauter la calotte crânienne et on extrait soigneusement le cerveau total, que l'on lave avec du sérum physiologique pour élimi-

ner le sang vasculaire et qu'on divise immédiatement en cinq parties selon la technique de Keeser comme le montre le dessin ci-contre en :

1 : Hémisphères cérébraux.

2 : Cerveau intermédiaire. { Région thalamique.
Corps striés.

3 : Cerveau moyen.

4 : Cervelet.

5 : Bulbe.

Chacune de ces portions est alors traitée selon la technique indiquée précédemment, et des sublimations pratiquées sur les cinq extraits donnent les résultats suivants :

Hémisphères cérébraux	0
Cerveau intermédiaire	+
Cerveau moyen	+
Cervelet	0
Bulbe	traces.

Deuxième expérience. — Localisation cérébrale chez un lapin de 2 kg. 580.

Dose totale injectée : 0,160. Soit 0,062 par kilogramme d'animal.

A 10 h. 10 : première injection de 0 gr. 050 de Gardénal soluble.

A 11 heures : deuxième injection de 0 gr. 050 de Gardénal soluble.

A 11 h. 30 : troisième injection de 0 gr. 060 de Gardénal soluble.

L'animal a encore réagi violemment lorsqu'on l'a placé sur la planche de contention pour la troisième injection, puis abandonné dans sa cage, il reste immobile dans la position classique du lapin.

Son sommeil était encore très léger, et un bruit voisin lui faisait diriger l'oreille dans sa direction, il fermait l'œil quand on lui passait rapidement la main devant.

On le sacrifie à 12 h. 30.

La microsublimation donna les résultats suivants :

Hémisphères cérébraux	traces.
Région thalamique et corps striés.	+
Cerveau moyen	0

Cervelet	0
Bulbe	+

Troisième expérience. — Lapin de 2 kg. 500.

Dose totale injectée : 0 gr. 200. Soit 0,080 par kilog.

A 10 heures, injection de 0,100 de gardénal soluble.

A 10 h. 30, deuxième injection de 0,100 de gardénal soluble.

Vingt minutes après la dernière injection, l'animal repose d'un sommeil paisible, sans paraître nullement incommodé. Il reprend toujours sa position normale lorsqu'on le déplace.

Le réflexe cornéen a gardé toute son intensité.

On sacrifie l'animal à 11 h. 50, par section de la carotide, on retire immédiatement le cerveau.

La microsublimation a donné les résultats suivants :

Hémisphères cérébraux	traces.
Région thalamique et corps striés.	++
Cerveau moyen	traces.
Cervelet	traces.
Bulbe	+

Quatrième expérience. — Lapin de 3 kg. 800.

Dose totale injectée : 0 gr. 400. Soit 0,105 par kilog d'animal.

A 10 heures : première injection de 0,20 de Gardénal soluble dans la veine de l'oreille.

A 11 heures : deuxième injection de 0,20 de Gardénal soluble dans la veine de l'oreille.

Après chaque injection que l'on prend la précaution de pousser très lentement, l'animal passe par une courte phase d'excitation variant de 5 à 10 minutes, faisant des soubresauts, grattant le grillage de sa cage et s'y cognant la tête dans un état d'ivresse barbiturique manifeste.

L'animal était évidemment très vieux, ses poils étaient blancs en bordure des paupières et il avait une plaie infectée suppurante du museau, il semblait donc en état de moindre résistance, nous ne l'avons pas saigné comme les précédents, voulant constater s'il supporterait 0,400 dans cet état.

A 15 heures, il dormait d'un sommeil profond et régulier.

A 17 heures il dormait toujours.

A 19 heures son état n'avait pas changé.

Le lendemain on le trouva mort dans sa cage.

Son cerveau retiré 22 heures après la dernière injection fut lavé au sérum physiologique et soumis à la microsublimation.

On eut les résultats suivants :

Hémisphères cérébraux	+
Région thalamique et corps striés.	++
Cerveau moyen	+
Cervelet	++
Bulbe	++

On voit que dans ce cas l'imprégnation du cerveau par le Gardénal était totale, bien que l'expertise fut très tardive. L'animal n'avait presque pas éliminé son gardénal à cause probablement d'une insuffisance hépato-rénale et il est mort intoxiqué par carence éliminatoire.

Cinquième expérience. — Lapin de 2 kg. 700.

Dose totale injectée : 0 gr. 300. Soit 0,111 par kilog d'animal.

A 8 h. 50 : première injection de 0,100 de Gardénal soluble.

Le lapin s'endort les yeux ouverts au bout de 20 minutes.

A 10 h. 30 : deuxième injection de 3 c.c. 5 contenant 0,20 de gardénal soluble.

Le lapin est fortement choqué, sa respiration est bruyante, hoquetée et lente pendant 5 à 6 minutes, puis elle redevient régulière. Il est couché sur le côté et reste dans la position qu'on lui donne. Le réflexe cornéen subsiste.

On le saigne à 14 h. 30, soit 4 heures après la dernière injection de 0 gr. 200. On trouve :

Hémisphères cérébraux	0
Région thalamique et corps striés.	+
Cerveau moyen	traces
Cervelet	0
Bulbe	+

Sixième expérience. — Lapin de 2 kg. 650.

Dose totale injectée : 0 gr. 300.

Dose par kilog d'animal : 0 gr. 113.

A 9 h. 50 : première injection de 0 gr. 150 de gardénal soluble.

A 10 h. 20 : deuxième injection de 0 gr. 150 de gardénal soluble.

Au moment de la deuxième injection le lapin ne faisait que somnoler et a réagi violemment lorsqu'on l'a placé sur la planche de contention. Une demi-heure après, soit à 10 h. 50, il dormait d'un bon sommeil.

On le sacrifie à 11 h. 50. On trouve :

Hémisphères cérébraux	+
Région thalamique et corps striés.	+
Cervelet	+
Cerveau moyen	+
Bulbe	++

On remarque l'imprégnation plus diffuse et plus marquée dans les différents territoires encéphaliques, résultant de ce que, d'une part, la dose est plus forte que dans les autres expériences (1, 2, 3, 4) et que comparativement à la précédente (5^e) l'examen fut pratiqué 1 heure au lieu de 4 heures après la dernière injection. L'élimination avait déjà marqué son action dans le cinquième cas.

Septième expérience. — Lapin de 2 kg. 020.

Dose totale injectée : 0 gr. 300.

Dose par kilog d'animal : 0 gr. 148.

A 11 h. 45 : première injection de 0,150 de gardénal soluble.

A 15 h. 15 : deuxième injection de 0,150 de gardénal soluble.

On le sacrifie à 16 h. 45. On trouve :

Hémisphères cérébraux	+
Région thalamique et corps striés.	++
Cerveau moyen	+
Cervelet	+
Bulbe	++

Huitième expérience. — Lapin de 3 kg. 280 (mâle).

Dose totale injectée : 0 gr. 500.

Dose par kilog d'animal : 0 gr. 152.

A 9 h. 30 : première injection de 0,150 de Gardénal soluble.

A 10 heures : deuxième injection de 0,150 de Gardénal soluble.

A 10 h. 30 : troisième injection de 0,100 de Gardénal soluble.

A 15 h. 30 : quatrième injection de 0,100 de Gardénal soluble.

Soit en 6 heures un total de 0,500 de Gardénal soluble.

Le lapin est sacrifié à 16 h. 30. Depuis la cinquième injection de 10 h. 30, il est en état de résolution musculaire totale.

On trouve :

Hémisphères cérébraux	+
Région thalamique et corps striés.	++
Cerveau moyen	+
Cervelet	+
Bulbe	++

Ici comme dans l'expérience précédente, les barbituriques ont diffusé dans tout l'encéphale avec prédominance dans le cerveau intermédiaire et dans le bulbe.

Les cristaux des sublimats étaient abondants et formaient à certains endroits de la lame des amas. Jamais nous n'avions obtenu une si forte quantité. Il y a donc bien une relation directe entre la quantité injectée et celle fixée. On remarquera de plus la grosse résistance du lapin envers la phényléthylmalonylurée. L'animal a en effet supporté en 6 heures 0 gr. 500 de ce dérivé et on a peine à croire qu'un homme de 60 kilogs serait capable de supporter par voie intraveineuse, dans le même temps, 9 grammes de cet hypnotique.

Nous avons voulu injecter une dose encore plus forte pour voir d'une part si le lapin la supporterait, et pour déterminer d'autre part un rapport quantitatif entre la dose injectée dans la veine et la quantité restant fixée dans le cerveau au bout de 1 h. 30. D'après nos expériences, il semble que ce soit entre 30 minutes et 2 heures après l'injection intraveineuse que la quantité fixée sur les centres nerveux est la plus importante.

Neuvième expérience. — Lapin de 2 kg. 500. Jeune mâle qui semble d'une robuste constitution.

Quantité totale injectée : 0 gr. 450 en 6 heures.

Dose par kilog d'animal : 0 gr. 180.

Le 24 février, à 10 heures : première injection de 0,100 de gardénal soluble.

Le 24 février, à 12 heures : deuxième injection de 0,100 de gardénal soluble.

Le 24 février, à 14 heures : troisième injection de 0,100 de gardénal soluble.

Le 24 février, à 16 heures : quatrième injection de 0,150 de gardénal soluble.

L'animal est dans un état de résolution totale. Le réflexe cor-néen qui persiste généralement dans les hypnoses profondes est presque totalement aboli. L'animal reste comme on le place, et n'obéit plus qu'aux lois de la pesanteur.

On lui ouvre la carotide à 17 h. 30.

Le cerveau qui pèse 22 gr. est traité selon le procédé indiqué ci-dessus.

L'extrait est sublimé deux fois pour éviter les pertes de produit. On dissout le sublimat avec quelques gouttes d'éther. On reprend par l'eau pour éliminer la cholestérine, filtre, évapore et pèse dans un cristalliseur taré.

On obtient ainsi 0 gr. 0065 de gardénal.

La teneur est donc pour 100 gr. de matière cérébrale 0 gr. 0295.

On constate qu'il suffit d'une faible quantité de phényléthyl-malonylurée fixée sur le cerveau pour produire un effet hypnotique puissant.

Sur 0 gr. 450 injecté en six heures on ne trouve à la 7^e h. 1/2 que 6 mm. 5 fixés sur la totalité de l'encéphale, soit 1,5 % de la dose totale.

RESUME

I. — La quantité de phényléthylmalonylurée nécessaire pour produire chez le lapin une hypnose profonde et durable (8 heures minimum) est variable suivant la résistance du sujet. Elle oscille pour le lapin normal aux environs de 100 mgr. par kilog d'animal.

II. — La quantité fixée sur les centres nerveux est faible, même pour une forte dose de gardénal injecté, 1,5 % pour une injection de l'ordre de 0 gr. 180 par kilog d'animal.

III. — Dans l'hypnose provoquée par le Gardénal nous avons constaté *une imprégnation de tous les territoires encéphaliques avec une prédominance dans la RÉGION THALAMIQUE et le BULBE.*

CHAPITRE VII

Résistance à la putréfaction des dérivés barbituriques

La question de la conservation des dérivés alcoylés de la malonylurée dans les viscères abandonnés à la putréfaction, est d'un grand intérêt pour le toxicologue, principalement dans les cas d'expertises médico-légales différées.

Cette question n'a guère été étudiée que par quelques auteurs en Allemagne et en Italie et pour le premier en date des hypnotiques barbituriques : le Véronal.

Les conclusions sont d'ailleurs divergentes. L'Ecole allemande soutient que le Véronal résiste très bien à la putréfaction. Ipsen (23) retrouva du véronal dans un contenu stomacal putréfié vieux de cinq ans, et Brüning et Kraft (5) dans une série de dosages sur des viscères d'intoxiqués, abandonnés à une putréfaction intense en dosèrent encore, après 1 an 1/2 des quantités appréciables.

Autenrieth (2) montra que si la recherche était le plus souvent négative sur des cadavres de sujets fortement présumés d'intoxication par le Véronal, c'est qu'il avait été éliminé en grande partie par l'urine avant la mort.

G. Sensi (39) qui a répété les expériences de Brüning et Kraft conclut à la très rapide disparition du Véronal au cours de la putréfaction cadavérique.

Du point de vue purement chimique, on voit difficilement pourquoi le véronal serait détruit par la fermentation.

Les produits de fermentation renfermant des amines et de

l'ammoniaque, les acides barbituriques, grâce à leur groupement amide acide, passent à l'état de sels, en présence des alcalins et ne doivent rien donner d'autre.

Le fait d'ailleurs que le Véronal est éliminé en nature et en presque totalité plaide en faveur de sa résistance aux agents biologiques.

Sa destruction au cours de la putréfaction, ne s'expliquerait que par une rupture du noyau malonique par les ferments bactériens. Il semble à priori que la résistance à la putréfaction devrait être proportionnelle à la résistance « in vivo » et que les dérivés comme le Véronal, qui sont éliminés en nature à raison de 80 % et même 90 %, devraient mieux résister aux fermentations bactériennes que le diallyl, le phényléthyl et l'isopropylallylmalonylurée, qui ne sont guère éliminés qu'à raison de 20 à 30 % en nature.

Or l'expérience n'a pas justifié cette hypothèse. On sait que, au cours de l'intoxication, même à issue fatale, par les dérivés barbituriques, l'élimination urinaire se poursuit activement, et que la première chose à faire en autopsiant est de mettre soigneusement à part la vessie gonflée d'urine (rétention très fréquente) dont on retirera la plus grosse partie des hypnotiques ingérés. Au cours des premiers jours de la putréfaction, l'urine fermente, la vessie éclate et l'urine se répand dans l'abdomen. Les dérivés barbituriques subissent donc l'action des ferments et des bactéries dans le milieu urinaire beaucoup plus qu'au sein des tissus où ils ne sont déjà plus.

Aussi, nos essais d'altération ont-ils porté sur des barbituriques en solution dans l'urine. On évitait ainsi une expérience difficile de putréfaction de viscères à longue échéance, qui n'est pas possible dans tous les laboratoires. Une quantité connue d'hypnotique pulvérisé était dissoute dans une certaine quantité d'urine, que l'on abandonnait ensuite à la putréfaction et l'on dosait au bout d'un certain temps la quantité résiduelle de principe actif.

Première expérience. — (Dial).

On met 0 gr. 30 de diallylmalonylurée en dissolution dans 1 litre d'urine environ. On abandonne à la putréfaction à l'air libre durant un mois.

Au bout de ce temps l'urine est acidifiée faiblement avec de

l'acide acétique, déféquée par le sous-acétate de plomb au 1/10, et épuisée à l'éther plusieurs fois en milieu acide.

Les liqueurs éthérées réunies, desséchées sur du sulfate de soude anhydre, sont évaporées avec précaution. Le résidu cristallisé est repris par l'eau chaude en présence de charbon animal. On filtre et laisse cristalliser après concentration.

On obtient ainsi, 0 gr. 203 de Dial fondant à 165°-170°.

Résultat. — Au bout d'un mois dans une urine en fermentation le tiers du Dial a disparu.

Remarque. — Avant de précipiter par le sous-acétate de plomb nous avons acidulé avec l'acide acétique afin d'éviter les gros précipités de plomb en liqueur alcaline qui peuvent entraîner une quantité appréciable de dérivés barbituriques.

Deuxième expérience. — (Véronal) :

1 litre d'urine renfermant en dissolution 0,30 de diethylmalonylurée fut abandonnée à la putréfaction pendant 4 mois 1/2.

Afin d'éviter les précipités par entraînement de plomb, nous avons employé une autre méthode d'extraction recommandée par divers auteurs (Kohn-Abrest).

On concentre l'urine par évaporation et on l'additionne d'un excès d'alcool à 95°, on acidule fortement par l'acide tartrique. On filtre, on distille l'alcool.

Le résidu aqueux acide est épuisé d'abord par l'éther de pétrole que l'on décante et jette.

On alcalinise alors légèrement et épuise par l'éther ordinaire. Après cette double purification en milieu acide et alcalin, on réacidifie par l'acide sulfurique dilué et on épuise trois fois à l'éther. Les liqueurs éthérées réunies sont desséchées sur du sulfate de soude anhydre et évaporées à l'air libre. Le résidu repris par l'eau chaude, en présence de charbon de sang, est filtré, concentré et abandonné à la cristallisation.

Pour achever la purification nous avons repris par l'eau et ajouté quelques gouttes de sous-acétate de plomb et, après élimination du plomb, extrait à nouveau par l'éther en milieu acide.

Le résidu d'extraction est desséché et pesé.

On obtient ainsi :

0 gr. 106 de Véronal.

Comme on était parti de 0 gr. 300.

La perte est donc de 0,194.

Soit une perte de 64,6 %.

Troisième expérience. — Mis 0,300 de butylethylmalonylurée (Soneryl) dans 1 litre d'urine. Abandonné 4 mois 1/2 à la fermentation.

On isole au bout de ce temps :

0,115 de Soneryl.

Soit une perte de 0,085 pour 0,300 :

Ou une perte de 61,6 %.

Quatrième expérience. — (Gardénal) :

Mis 0,300 de phényléthylmalonylurée dans 1 litre d'urine.

Abandonné 4 mois 1/2 à la putréfaction.

On isole au bout de ce temps.

0,1745.

Il s'est détruit donc 0 gr. 1255.

Soit une perte de 41,8 %.

Cinquième expérience. — (Somnifène) :

On met dans un litre d'urine 3 c.c. de Somnifène.

Soit un mélange de :

0,30 de diéthylmalonylurée,

0,30 d'isopropylallylmalonylurée.

Au bout de 4 mois 1/2 on isole :

0,2545 d'un mélange cristallin.

Soit 42,33 %.

La perte au cours de la putréfaction est donc de 57,67 %.

Sixième expérience. — *Résistance à la putréfaction du Gardénal dans les tissus :*

Nous avons abandonné pendant deux mois dans un cristalliseur couvert un foie de lapin qui avait reçu une injection intraveineuse : 0 gr. 500 de Gardénal soluble dans l'espace de 6 heures.

Au moment de l'extraction le foie pèse 85 gr. Il est réduit à l'état de bouillie d'odeur infecte et couverte de moisissures. On le hache finement au couteau sur une plaque de verre.

On acidule avec de l'acide tartrique et épuise trois fois par un contact de 24 heures avec de l'alcool à 95° dans l'étuve à 50° en agitant souvent.

On réunit les filtrats alcooliques, distille l'alcool en présence d'un peu d'eau.

Le résidu aqueux est additionné du 1/10 de son volume environ de solution de chlorure de baryum à 10 %. On laisse le précipité se rassembler et on filtre.

On précipite alors le baryum en excès par une solution d'acide sulfurique à 10 %.

On filtre. Le filtrat acide est épuisé trois fois à l'éther.

On extrait ainsi :

0 gr. 053 de Gardénal.

CONCLUSIONS

Les dérivés barbituriques résistent à la putréfaction urinaire même très avancée. Au bout de 4 à 5 mois on en retrouve de 30 à 40 % sans que l'on puisse dire que l'un soit nettement plus stable que l'autre vis-à-vis des ferments de la putréfaction.

Le Gardénal peut être décelé dans les tissus de lapins intoxiqués (foie) même après une liquéfaction des tissus par les ferments protéolytiques et les moisissures, consécutive à une putréfaction de deux mois.

CHAPITRE VIII

Conclusions

Les recherches que nous venons d'exposer nous ont conduit aux résultats suivants :

I. — En plus des réactions colorées signalées par les divers auteurs nous avons déterminé que :

Le réactif sulfo-vanillique, récemment préparé, donne avec des traces de diallylmalonylurée une belle coloration rouge cerise. Parmi les barbituriques usuels, il est le seul à donner cette réaction.

Le réactif sulfo-vanillique peut donc être utilisé avec intérêt, dans les conditions que nous avons fixées, pour identifier le Dial à l'état de traces quand il est impossible de prendre un point de fusion ou de faire un dérivé xanthylé.

II. — Dans la recherche des dérivés de la malonylurée par la méthode de Stas-Otto-Ogier, on est souvent gêné par des émulsions tenaces au cours de l'épuisement par les solvants volatils des liqueurs aqueuses résultant de l'évaporation de l'alcool. Nous avons montré, en collaboration avec M. Cheramy, que l'addition d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100, suivie de l'élimination du baryum par l'acide sulfurique dilué, permet d'obtenir un liquide limpide, se prêtant bien aux extractions par les solvants volatils.

Nous nous sommes assurés que ce déféquant était sans action sur les dérivés barbituriques.

Cette technique est particulièrement intéressante pour purifier les extraits hépatiques.

III. — Dans certains cas la méthode de protéolyse pancréatique de M. Fabre nous a donné de très bons résultats, particulièrement pour le sang.

Quand on opère sur des quantités importantes de sang coagulé il est utile, comme nous l'avons montré, de dilacérer le caillot, en le triturant au mortier avec du sable, pour faciliter l'attaque trypsique.

D'autre part nous avons constaté qu'en saturant le liquide de digestion par le sulfate d'ammoniaque et filtrant, on facilite beaucoup l'épuisement par les solvants volatils.

IV. — Au cours des extractions portant sur les organes très riches en lipoides, tels que le cerveau, il importe de pratiquer, suivant notre technique, un double épuisement : en milieu acide par l'éther de pétrole et en milieu alcalin par l'éther sulfurique. L'élimination des impuretés est ainsi presque totale et les extractions et cristallisations finales des dérivés barbituriques sont bien simplifiées.

V. — La recherche des dérivés barbituriques, dans les urines de malades absorbant quotidiennement ces produits à doses thérapeutiques, nous a permis de montrer que l'élimination urinaire s'effectuait de la manière suivante :

a) Pour le véronal on retrouve environ 80 p. 100 de la dose quotidienne absorbée.

b) Pour le gardénal on ne peut en déceler que 30 p. 100.

c) Pour un mélange à parties égales de Diéthyl- et d'isopropyl-malonylurée (sommifène) on ne retrouve que 18 à 20 p. 100 du produit ingéré. Dans ce cas la destruction du véronal dans l'organisme semble donc plus importante que lorsqu'il est absorbé seul.

Ces variations dans le taux de l'élimination suivant que l'hypnotique est employé seul ou associé à d'autres, peuvent expliquer les résultats contradictoires signalés par les auteurs au cours des recherches toxicologiques.

VI. — Avec le docteur Tardieu nous avons pratiqué des essais de localisation cérébrale, par la méthode de microsublimation, à l'aide d'un appareil spécial que nous avons imaginé. Après injection dans la veine du lapin de doses hypnotiques croissantes de gardénal soluble, nous avons décelé ce dérivé à l'état diffus dans tous les territoires

encéphaliques, avec une prédominance marquée pour la région thalamique et le bulbe.

VII. — Afin de nous rendre compte de l'effet de la putréfaction sur les dérivés de la malonylurée nous avons abandonné à elles-mêmes des urines contenant en dissolution des barbituriques usuels. Au bout de quatre mois et demi nous avons pu retrouver 30 à 40 p. 100 de la dose initiale.

Nos expériences ne nous ont pas permis de constater de différences sensibles dans la résistance à la putréfaction de ces divers hypnotiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANON. — Les hypnotiques de la série barbiturique (Améri. J. Pharm. 1928, t. XCIX, p. 692).
2. AUTENRIETH. — Ein Fall von Medinal Vergiftung und über die Auffindung des veronals im Harn bei einer derartigen Vergiftung. (Chem. Zentrabl. 1921, B. d. 45, S. 9.)
3. BROUN (D.). — C. R. Soc. biol., t. XCIX, p. 17-92, 198 et t. C., p. 703.
4. BROUN (D) et GARCIA. — C. R. Soc. biol. 1928, t. XCIX, p. 1852.
5. A. BRUNING et F. KRAFT. — Beiträge zum Nachweis von Pflanzengiften und Arzneimitteln in alteren Leichenteilen. (Arch. der Pharm. und Berichte der deutsch. Pharm. gesellschaft, déc. 1927.)
6. CARNOT et TIFFENEAU. — C. R. Soc. biol, t. CLXXV, p. 241, 1922.
7. DELEPINE (M.). — Elimination des dérivés de la malonylurée. (C. R. Soc. de Chirurgie, p. 798, 1924.)
- 7 bis. DUFFOORT. — Recherche sur la microsublimation. Thèse de Doctorat (Pharmacie), Lille 1928.
8. EHRISMANN (O.). — Sur la pénétration des hypnotiques barbituriques et uréiques dans le système nerveux central. (Arch. für exp. path. und pharmaco. 136, 113, 119, octobre 1928.)

9. EHRISMANN (O.) et JOACHIMOGLU (G.). — Sur la recherche de quelques dérivés barbituriques dans l'urine. (Biochemis. Zeitschri. 199, p. 272, 1928.)
Ber üd. ges. Physio et exp. Pharmacol. 1928, 47, 792.
10. EKKERT (C.). — Sur une réaction colorée du Véronal-Luminal. Proponal. (Pharma. Zeitung, nov. 26, Ber. d. Ungar. Pharm. ges.).
11. EKKERT (L.). — Contribution à la destruction du Véronal-Luminal-Proponal. (Pharmaz. Zeitung, juillet 26, p. 880.)
12. FABRE (René). — Sur l'hydrolyse des dérivés xanthylés du Véronal et des hypnotiques de la série barbiturique. Son importance en toxicologie. Journ. de Pharm. et de Chim. (7), XXVII, p. 337, 1923.
13. FABRE (René). — Sur une réaction du Véronal et des hypnotiques dérivés de l'acide barbiturique. Applications. Journ. de Pharm. et de Chim. (7), XXVI, p. 241, 1922.
14. FABRE (René) et FREDET (Pierre). — Etude de la localisation et de l'élimination de quelques dérivés alcoylés de la malonylurée. (Journ. de pharm. et de chim. 1925. 2 (8) p. 321.)
15. FABRE et FREDET. — Contribution à l'étude de la localisation et de l'élimination de quelques dérivés barbituriques. Bulletin Soc. de Chim. biologique tome VII n° 9 oct. nov. 1925.
16. FISCHER (E.) et Von MERING. — Sur une nouvelle classe d'hypnotiques (Thérapie der Gegenwart fasc. 3. 1903.)
17. FLEURY (P.). — Action des sels de mercure sur les véronals. Quelques applications analytiques. (Journ. de Pharm. et de Chim. 1925 2 (8) p. 456.)
18. FLEURY (P.). — Etude quantitative de l'action des sels de mercure sur les acides dialcoyllibarbituriques. I. Dérivés phénylhyllé, diéthylé, butylethylé. (Bull. de la Soc. Chim. 27.28

N° 12 P. 1656). II. Dérivés diallylé et isopropylallylé.
(Bull. de la Soc. Chim. 29 t. 99 nov. 25).

19. FLEURY et GUINNEBAULT. — Apparition et élimination du Véronal dans l'Urine. *Compt. rendus Soc. Biolog.* 93 1508-10 1925.
20. GLYCART (C. K.). — Sur une méthode de recherche du Luminal et du Véronal (*Jour. Assoc. of. Agric. Chemist.* 8. 21. 22. Chicago (III)).
21. HALBERKANN (J.) und REICHE (K.). — Über die Ausscheidung einige viel verwendeter barbitursäureverbindungen mit dem Urin. (*Münch. med. Wochenschr.* 1927 S. 1450.)
22. HANDORF (H.). — Ein neues Princip. zum Nachweis der Veronal-gruppe. Kritische beiträge zur Diagnose der Veronalintoxication (*Zeitschr. f. d. ges. exp. Méd.* 1922 Bd. 28 P. 241).
23. IPSEN (C.). — Conservation du Véronal (Résistance à la putréfaction) *Wien. med. Wochschr.* 74. 2028. 28. Innsbrück).
24. ISNARD. — Etude sur le Dial. Dial sodique. *Jour. de pharm. et de chim.* XXIX p. 272 1924.
25. KEESER (E. et I.). — Sur la localisation du Véronal, Gardénal et Dial dans le cerveau (*Arch. für exp. Pathol. und pharmaco.* 125 251.56 ann. 1927).
26. KEESER (E. et I.). — Sur la recherche de la caféine, morphine et des acides barbituriques dans le cerveau (*Arch. für exp. Patho. und Pharmaco.* 127. 230;35).
- 26 bis. KEMPF. — Praktische Studien über Vakuum Sublimation. *Journ. für prakt. Chemie. Neue Folge* 78. p. 201. 1908.
27. LAMI (P.). — Action du chlorure mercurique sur les sels de sodium de véronal et d'acide phénylethylbarbiturique (*Bull. Chimico-Formaceutico* t. LIII p. 193, 1914).

28. MOLLE et KLEIST. — Caractérisation qualitative et quantitative du véronal. *Archiv. der Pharmacie* Bd. 242 p. 401.
29. NOLTE (E.). — Uber der Nachweis von Luminal (*Pharmazeut. Zeit.* 1920 Bd 65. T. 320).
30. PARRI (W.). — Un gruppo di reazioni colorate del veronal *Boll. chimico. farm.* 1924. T. 63. p. 401.
31. PICK (E. P.). — Sur le sommeil et l'hypnotique (J. Springer. Wien 1927).
32. PISSOT (G.). — Toxicité du véronal et des dérivés de l'acide barbiturique. Thèse Paris 26.
33. POHL (Jul.). — Uber Allylbarbitursäuren (*Ebenda.* 1923 Bd. 38. S. 520).
34. RANWEZ (F.). — Réactions caractéristiques du Luminal. *Journ. de pharm. de Belgique* 1924. T. 6. p. 410 et 501.
35. REDONNET (Alday). — Contribution à l'étude pharmacodynamique et toxicologique du somnifène. *Arch. intern. de pharmaco. et thérap.* XXX. 3. 4. 1925.
36. REDONNET (A.). — Estudio farmacologico del somnifero. Los progresos de la clinica XXVII p. 145. 1924.
37. REINERT (Marc). — Sur l'élimination des dérivés barbituriques dans l'urine du chien (*Arch. für exp. Patho. und Pharmac.* 130. 49. 60 Hoffmann Laroche 1927).
38. RUPP (E.) et MULLER (K.). — Sur les combinaisons argentiques du Médinal et ses réactions d'identité. *Archiv. der pharm. amd Berichte der deutschen pharm. Gesells.* - Mai 26 p. 362.
39. SENSI (G.). — Elimination et recherche toxicologique du Véronal (*Annali di Chimica applica* 17. 1927 p. 447).
40. SOMMAIRE. — Sur quelques nouveaux acides diallylbarbituriques dissymétriques. Thèse de Pharmacie. Paris 1923.
41. TAGLIARINI. — Action du nitrate de mercure sur le Véronal. *Bull. Chimico. Farmaceutico* t. XLV. 105-107 (1906).

42. TARDIEU (A.). — Intoxication aiguë par les Uréides. Véronalisme aigu (Rev. de Méd. 7. 1924).
43. TARDIEU (A.). — Intoxication aiguë par le Véronal et les autres dérivés de la malonylurée (barbiturisme) Thèse Paris 1924.
44. TARDIEU (A.) et CAMPS (S.). — Intoxication aiguë volontaire par l'ingestion de 24 grammes de Véronal, diplopie, guérison (Soc. de Thérap. 13 fév. 24).
45. TARDIEU (A.) et MEDIONI (A.). — Une contradiction formelle à l'emploi des uréides (Journ. de Méd. de Paris n° 17, 1924).
46. TIFFENEAU (M.). — La pharmacologie en 1929. Paris Médical n° 24, juin 29.
47. TUNMANN (O.). — Caractérisation microchimique du Véronal. Journ. de pharm. et de chim. XVII p. 375. 1918 d'après Apoth. Zeit. XXXII p. 289. 1917.
48. VAN ITALLIE et STEENHAUER. — Dosage du Véronal dans l'urine et les organes humains (7) XXV p. 231. 1922 d'après Pharm. Weekblad, LVIII p. 1062. 1921.
49. VAN ITALLIE et VAN DER VEEN. — Réactions microchimiques sur le Véronal, le Luminal, le proponal. Journ. de pharm. et de chim. (7) XX. 1919.
50. WETSLAR (J. K.). — Eine Luminalvergiftung (Ref. Chem. Zentralblatt 1922 Bd. 65 S. 236).

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse

GUERBET.

Vu :

Le Doyen de la Faculté :

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer ;

Le Recteur de l'Académie de Paris

S. CHARLÉTY.

